

**UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENGENHARIA
CAMPUS SÃO PAULO - ITAQUERA**

SILVANA CAMPOS

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA ASSOCIAÇÃO DO
BIOPOLÍMERO DE FIBRINA COM NITRATO DE PRATA**

**MICROBIOLOGICAL ASSESSMENT OF THE ASSOCIATION OF
FIBRINE BIOPOLYMER WITH SILVER NITRATE**

**SÃO PAULO/SP
2021**

SILVANA CAMPOS

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA ASSOCIAÇÃO DO
BIOPOLÍMERO DE FIBRINA COM NITRATO DE PRATA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

Prof. Dr. José Carlos Cogo
Orientador

Prof^a Dr^a Silvia Cristina Nunez
Coorientadora

São Paulo – SP
2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

C217a CAMPOS, Silvana

Avaliação Microbiológica da Associação do Biopolímero de Fibrina com o Nitrato de Prata / Silvana Campos. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2021.

71 f.: il. color.

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Bioengenharia da Universidade Brasil.

Orientação: Prof. Dr. José Carlos Cogo.

Coorientação: Prof. Dr. Silvia Cristina Nuñez.

1. Biopolímero de Fibrina. 2. Nitrato de Prata. 3. *Crotalus durissus terrificus*. 4. Antimicrobiano. 5. Selante de fibrina heterólogo.
I. Cogo, Jose Carlos. II. Nuñez, Silvia Cristina. III. Título.

CDD 620.82



TERMO DE APROVAÇÃO

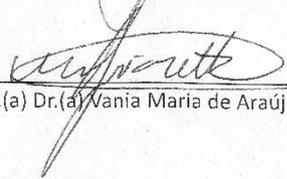
SILVANA CAMPOS

"AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA ASSOCIAÇÃO DO BIOPOLÍMERO DE FIBRINA COM NITRATO DE PRATA"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre no Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:


Prof.(a) Dr.(a) Jose Carlos Cogo (presidente-orientador)


Prof.(a) Dr.(a) Alessandra Baptista (UNIVERSIDADE BRASIL)


Prof.(a) Dr.(a) Vania Maria de Araújo Giaretta (UNITAU)

São Paulo, 23 de fevereiro de 2021
Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a). José Carlos Cogo

Houve alteração do Título: sim () não ()



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respectivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

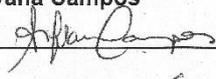
A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **“AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA ASSOCIAÇÃO DO BIOPOLÍMERO DE FIBRINA COM NITRATO DE PRATA”**

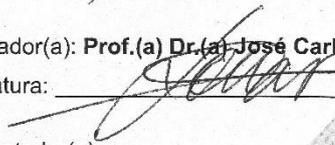
Houve alteração do Título: sim () não ():

Autor(es):

Discente: **Silvana Campos**

Assinatura: 

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) José Carlos Cogo**

Assinatura: 

Coorientador(a):

Assinatura: _____

Data: 23/02/2021

DEDICATÓRIA

*Ao meu filho Felipe, grande colaborador e incentivador.
Pela Amizade, Carinho, e Companheirismo de sempre! Luz da minha vida!*

*Aos meus Pais, Pedro (in memoriam) e Celina,
pelo simples fato de serem a razão da minha existência,
pelo Amor, Dedicção! Meu maior exemplo!
Gratidão Eterna!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e colocar pessoas maravilhosas na minha trajetória, as quais me fazem acreditar num mundo bem melhor e me encorajam a prosseguir. Obrigada por sempre iluminar o meu caminho!

À minha mãe e meu pai (in memoriam) deixo um agradecimento especial por serem o exemplo vivo de dedicação, amizade, companheirismo, compreensão, de AMOR incondicional! Amo vocês!

À minha família, sinônimo de amor e união. Obrigada por acreditar em mim e sempre me motivar a seguir em frente e compreenderem a minha ausência durante esta jornada. É muito bom saber que posso contar com vocês em todos os momentos. Obrigada Felipe, Gleicy, Danielle e Fagner!

Ao meu orientador Dr. José Carlos Cogo, pela oportunidade de realizar este trabalho, por me ajudar em todos os momentos que precisei, pela confiança e paciência durante este processo e pelas leituras, revisões, questionamentos e discussões sempre tão produtivas. Gratidão!

A Dr^a Silvia Cristina Nunez coordenadora do curso e coorientadora deste trabalho, sempre pronta para ajudar e fazer aflorar as nossas potencialidades maiores a encontrar soluções, abrindo um leque de possibilidade para a melhor resolução. Sua contribuição é essencial para desenvolvimento de todas as pesquisas realizadas neste Programa de Pós-Graduação. Através da sua conduta de exímia pesquisadora se torna um Exemplo para aqueles que transformam o aprendizado em Ação! Gratidão, minha querida!

Aos queridos professores Dr^a Amanda Farage Frade, Dr. Rodolfo de Paula Vieira e Dr. Ricardo Henrique Marques, obrigada pela dedicação, competência, apoio e todo conhecimento compartilhado!

Ao Dr. Ricardo S Navarro um agradecimento especial pela contribuição, incentivo e ensinamento na produção científica. Gratidão!

A Dr^a Alessandra Baptista, uma incentivadora nata e uma das responsáveis pelo meu ingresso na Pós-Graduação. Que fui privilegiada por sua presença na banca de exame de qualificação. Obrigada pelas suas sugestões valiosas e confiança ao longo do curso de graduação e no mestrado, sempre tão presente durante todo o desenvolvimento deste trabalho e apontando relevâncias enriquecedoras para melhor construção desta pesquisa. Agradeço do fundo do coração!

Ao Dr. Daniel S F Magalhaes por compor a banca de exame de qualificação e pela colaboração e apoio que foram fundamentais para o enriquecimento desse trabalho. Seu senso de organização e impecável, ordenar as coisas economiza energia. Isto me fez lembrar a frase de um Amigo: “A Organização é sinal de Evolução”. Obrigada por mais este exemplo, que com certeza faz toda diferença em nossas vidas!

A Dr^a Vânia Giarretta e Agnaldo Garcez por terem atendido ao convite de compor a banca examinadora, dispondo de seu tempo e conhecimento para analisar este trabalho, e abrilhantaram este evento com suas experiências apontando suas sugestões e considerações que guiaram a confecção final desta pesquisa.

Ao CEVAP aqui representados pelas pessoas de Dr. Rui Seabra Ferreira Junior e Dr. Benedito Barraviera, pela oportunidade de realizar este trabalho, toda colaboração e doação do Biopolímero de Fibrina, ponto central desta pesquisa o que permitiu a sua execução. Gratidão!

Aos queridos Denis Honorato e Mohamed Abdul Karim Saleh os quais passei a ter uma maior admiração em nossa convivência nas práticas laboratoriais pela determinação, comprometimento e responsabilidade com o que fazem, admiração esta que já existia pela conduta exemplar como professores. Agradeço a amizade, toda colaboração e momentos agradáveis que convivemos no laboratório!

Um agradecimento especial para querida Loana Damares de Sousa sem a sua colaboração nada disto seria possível, você foi imprescindível, sua contribuição valiosa viabilizou todo o processo, sempre disponível quando precisei. Serei eternamente grata não só por toda ajuda, mas pelos laços de amizade fortalecidos neste processo!

A Amanda, Daniela e Roseane pelos trabalhos e disciplinas realizadas em conjunto. Obrigada por todo o apoio e colaboração ao longo desta caminhada e principalmente pela amizade que levarei por toda a vida. Gratidão Meninas!!!

A Universidade Brasil pela bolsa de estudo e pela oportunidade de conquistar tantos amigos entre os colaboradores, professores e alunos! Gratidão!!!

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

“Existe algo grandioso, grande demais para ser conceituado no nosso minúsculo cérebro, algo magnífico que não pode ser ainda compreendido por um cérebro que tem somente como elementos de raciocínio temas tridimensionais. À medida que novos elementos – elementos que são considerados abstratos –, à medida que esses elementos começam a formar uma pequena imagem em um cérebro, por mais inconcebível que ainda seja, o reino de todas as possibilidades vai aparecendo e a compreensão vai se estabelecendo, o entendimento vai se dando e a mudança geral acontecerá. Portanto, por mais que queiram tentar racionalizar, poderão racionalizar com todos os assuntos que concernem ao plano racional, racional de agora, que não quer dizer eternamente racional. Eu quero dizer que, enquanto tivermos somente elementos tridimensionais, o nosso cérebro vai raciocinar com esses elementos. Portanto, muitas possibilidades que existem não encontram hoje, no nosso cérebro, a chamada lógica, uma vez que o nosso cérebro não dispõe de elementos para a compreensão de tudo aquilo que transcende ao puro materialismo racional de nossos dias, adiantado por sinal.”

16 de julho de 1980

Dr. Celso Charuri

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENGENHARIA

SILVANA CAMPOS

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA ASSOCIAÇÃO DO BIOPOLÍMERO DE FIBRINA COM NITRATO DE PRATA

Área de concentração: FOTOBIMODULAÇÃO, BIOMARCADORES E SISTEMAS DIAGNÓSTICOS

Projeto de pesquisa: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE EQUIPAMENTOS E PRODUTOS APLICADOS AO CUIDADO DA SAÚDE

Linha de pesquisa: AVALIAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIAS APLICADAS AO CUIDADO A SAÚDE

Relevância para bioengenharia: trata-se de um trabalho onde foi avaliado *in vitro*, utilizando técnicas de cultura de bactérias, a utilização do nitrato de prata juntamente com o biopolímero de fibrina desenvolvido a partir do veneno de cascavel para possível aplicação na cicatrização de feridas. Será muito útil na recuperação de pacientes com feridas superficiais.

RESUMO

Os selantes de fibrina, também conhecidos como biopolímero de fibrina (BPF), são matrizes biológicas oriundas do plasma humano, totalmente reabsorvíveis, que mimetizam os últimos estágios da cascata de coagulação durante o qual o fibrinogênio é convertido em um coágulo de fibrina estruturado e insolúvel. O BPF desenvolvido a partir do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, apresenta uma excelente alternativa para a engenharia de tecidos e modulação celular. Seu uso como cicatrizante de úlceras venosas em membros inferiores mostrou-se seguro e com potencial eficácia em um estudo clínico de fase II. **Objetivo:** Investigar o efeito antimicrobiano da associação do biopolímero de fibrina com o nitrato de prata. Esta associação permitirá seu uso em feridas contaminadas e colonizadas, o que atualmente leva a suspensão do tratamento com o BPF. **Métodos:** O BPF é preparado a partir de 2 componentes ativos e um diluente. Diferentes concentrações de nitrato de prata foram misturadas aos componentes do BPF. Os coágulos contendo o nitrato de prata foram inseridos nos poços perfurados no ágar em placas de Petri contendo meio de cultura ágar Mueller Hilton previamente semeadas com culturas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Foram utilizadas as concentrações de nitrato de prata formando os seguintes Grupos: Controle - NP1=1mg/mL; NP2= 2,5mg/mL e NP3= 5mg/mL de nitrato de prata; Grupo experimental: as mesmas concentrações utilizadas no Grupo controle associado ao BPF e controle positivo com antibióticos. Foi verificada a presença e mensurado o halo de inibição presente em cada uma das placas testadas. Foram realizados testes da concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) visando estabelecer a menor concentração do BPF+NP e NP capaz de inibir as cepas testadas. Foram considerados valores médios e medianos dos diâmetros com medidas de tendência central e desvio padrão e intervalo interquartil como medidas de dispersão das amostras e verificação da eficácia antimicrobiana. **Resultados:** Foi observada diferença significativa nos halos de inibição dos tratamentos com NP quando comparados com BPF+NP. Houve uma diferença estatística nos halos de inibição da bactéria gram-negativa em relação com a bactéria gram-positiva, no tratamento com NP, NP3 apresentou uma diferença significativa em relação a NP2 frente a *E. coli* enquanto *S. aureus* não apresentou diferença estatisticamente significativa. O BPF isolado não formou halo de inibição. BPF+NP teve um efeito inibitório da ação antimicrobiana do NP em 18,2% para *E. coli* e 13,5% para *S. aureus* quando comparado com o tratamento NP. A CIM encontrada para *E. coli* e *S. aureus* quando testada com BPF+NP foram 7,81 e 250 µg/mL e com NP 3,9 e 7,81 µg/mL. Enquanto CBM encontrada para BPF+NP foram de 15,62 e 1000 µg/mL e para o tratamento com NP de 7,81 e 15,62 µg/mL respectivamente. **Conclusão:** O BPF+NP e NP apresentaram efeito antibacteriano sobre as espécies de bactérias gram-negativas e gram-positivas, demonstrando maior eficácia para *E. coli*. Observou-se que BPF quando isolado não tem efeito antibacteriano e quando associado ao NP produz ação antibacteriana, mas o efeito é menor do que o promovido pelo NP.

Palavras-chave: biopolímero de fibrina. selante de fibrina heterólogo. *Crotalus durissus terrificus*. nitrato de prata. antimicrobiano.

ABSTRACT

Fibrin sealants, also known as fibrin biopolymer (BPF), are biological matrixes from human plasma, fully resorbable, that mimic the last stages of the coagulation cascade during which fibrinogen is converted into a structured and insoluble fibrin clot. BPF developed from the snake venom *Crotalus durissus terrificus*, presents an excellent alternative for tissue engineering and cell modulation. Its use as a healer for venous ulcers in the lower limbs proved to be safe and potentially effective in a phase II clinical study. **Objective:** To investigate the antimicrobial effect of the association of fibrin biopolymer with silver nitrate. This association will allow its use in contaminated and colonized wounds, which currently leads to suspension of treatment with BPF. **Methods:** BPF is prepared from 2 active components and a diluent. Different concentrations of silver nitrate were mixed with the BPF components. The clots containing silver nitrate were inserted into the wells drilled on the agar in Petri dishes containing the culture medium of Mueller Hilton agar previously seeded with cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Silver nitrate concentrations were used, forming the following groups: Control - NP1 = 1mg / mL; NP2 = 2.5mg / mL and NP3 = 5mg / mL silver nitrate; Experimental group: the same concentrations used in the control group associated with BPF and positive control with antibiotics. The presence was verified and the inhibition halo present in each of the tested plates was measured. Tests of minimum inhibitory concentration (CIM) and minimum bactericide (CBM) were carried out to establish the lowest concentration of BPF + NP and NP capable of inhibiting the tested strains. Mean and median values of diameters with measures of central tendency and standard deviation and interquartile range were considered as measures of sample dispersion and verification of antimicrobial efficacy. **Results:** A significant difference was observed in the halos of inhibition of treatments with NP when compared with BPF + NP. There was a statistical difference in the inhibition halos of the gram-negative bacteria in relation to the gram-positive bacteria, in the treatment with NP, NP3 showed a significant difference in relation to NP2 compared to *E. coli* while *S. aureus* did not present a statistically significant difference. BPF alone did not form an inhibition halo. BPF + NP had an inhibitory effect on the antimicrobial action of NP by 18.2% for *E. coli* and 13.5% for *S. aureus* when compared to NP treatment. The CIM found for *E. coli* and *S. aureus* when tested with GMP + NP were 7.81 and 250 µg / mL and with NP 3.9 and 7.81 µg / mL. While CBM found for BPF + NP they were 15.62 and 1000 µg / mL and for treatment with NP 7.81 and 15.62 µg / mL respectively. **Conclusion:** It was possible to verify by the results that the NP and BPF + NP showed antibacterial effect on the species of gram-negative and gram-positive bacteria, demonstrating greater efficacy for *E. coli* and that the antibacterial activity of the NP was more effective than the BPF + NP. He observed that GMP when isolated has no antibacterial effect.

Keywords: fibrin biopolymer. heterologous fibrin sealant. *Crotalus durissus terrificus*. silver nitrate. antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Selante de Fibrina Heterólogo produzido pelo CEVAP	19
Figura 2 - Eventos que ocorrem com o biopolímero de fibrina derivado de veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e fibrinogênio de <i>Bubalus bubalis</i> imitando o final da cascata de coagulação	20
Figura 3 - Ordenha do veneno de serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i> para extração da serina protease.....	24
Figura 4 - Selante de Fibrina derivado de veneno de serpente e de sangue de búfalo produzido pelo CEVAP.....	28
Figura 5 - Comparação da turbidez da suspensão bacteriana com número 0,5 da escala McFarland.....	38
Figura 6 - Perfuração dos poços no ágar com seringa de 1mL adaptada	39
Figura 7 - Coágulo de BPF associado com NP	39
Figura 8 - Determinação dos halos de inibição frente aos microrganismos e tratamentos testados.....	40
Figura 9 - Halo formado no ensaio de disco difusão frente ao microrganismo <i>S. aureus</i> com disco contendo Oxacilina 1 µg medido em milímetros	41
Figura 10 - Tratamento NP1 sobre <i>S. aureus</i> antes e depois da incubação a 37° C por 20h44	
Figura 11 - Diâmetro dos halos de inibição nas diversas concentrações de NP – <i>E. coli</i>	45
Figura 12 - BFP isolado não promoveu halo de inibição frente a <i>E.coli</i> após 20h de incubação a 37° C.....	46
Figura 13 - Diâmetro dos halos de inibição nas diversas concentrações de NP com BPF – <i>E. coli</i>	46
Figura 14 - Efeitos dos antibióticos sobre <i>E. coli</i>	46
Figura 15 - Efeito inibitório dos BPFs sobre o NPs – <i>E. coli</i>	47
Figura 16 - Comparação dos halos de inibição dos NPs com BPFs+NPs e controles – <i>E. coli</i>	48
Figura 17 - Diâmetro dos halos de inibição nas diversas concentrações de NP – <i>S. aureus</i>	50
Figura 18 - Diâmetro dos halos de inibição nas diversas concentrações de NP com BPF – <i>S. aureus</i>	50
Figura 19 - Efeitos dos antibióticos sobre <i>S. aureus</i>	51
Figura 20 - Efeito inibitório dos BPFs sobre o NPs – <i>S. aureus</i>	51
Figura 21 - Comparação dos halos de inibição dos NPs com BPF+NPs e controles frente ao <i>S. aureus</i>	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos experimentais com Biopolímero de Fibrina.....	26
Tabela 2 - Artigos selecionados para coleta de dados do estudo.....	32
Tabela 3 - Formulação do biopolímero de fibrina	36
Tabela 4 - Concentrações do AgNO ₃ e associação do Biopolímero de fibrina com AgNO ₃	36
Tabela 5 - Concentração original e concentrações após diluição seriada com BPF+NP e NP.....	43
Tabela 6 - Limites aceitáveis dos halos de inibição dos antimicrobianos utilizados no controle de qualidade para monitorar a acurácia dos testes de disco difusão em organismos não fastidiosos – Técnica de difusão em ágar Mueller-Hinton.....	53
Tabela 7 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de BPF+NP e NP sobre bactérias gram-positiva e gram-negativa.....	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusão Cerebro e Coração - Caldo
BPF	Biopolímero de Fibrina
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CEVAP	Centro Estudos de Venenos e Animais Peçonhetos
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
NCCLS	Comitê Nacional de Laboratório Clínico
NP	Nitrato de Prata
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
h	Hora

LISTA DE SÍMBOLOS

Ag +	Cations de prata
AgCl	Cloreto de Prata
AgNO ₃	Nitrato de Prata
AgSD	Sulfadiazida de prata
M	Molar
mM	Milimolar
mcg	Micrograma
mg	Miligrama
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
ppm	Partes por milhão
°C	Graus Celsius
SH	Sulfidrila
μL	Microlitro
μg	Micrograma
°	Grau

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 REVISÃO DA LITERATURA	23
BIOPOLÍMERO DE FRIBRINA	23
Cola de fibrina um aspecto histórico	23
Biopolímero de fibrina obtido a partir de veneno de serpente	24
NITRATO DE PRATA	28
Prata: um aspecto histórico	28
A prata e sua ação bactericida e toxicidade	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO POR DIFUSÃO EM ÁGAR	36
Preparo das soluções antimicrobiana	36
Associação do BPF+ NP:	37
Determinação do espectro de ação	37
Preparo do inóculo	37
Inoculação das placas	38
Ensaio antimicrobianos poço difusão em ágar e leitura dos resultados	39
Ensaio antimicrobianos em disco difusão em ágar	40
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	41
Preparo das diluições na microplaca	41
Preparo da suspensão bacteriana	42
Inoculação da suspensão bacteriana	42
Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)	43
Análise estatística	43
5 RESULTADOS	44
<i>Perfil de Sensibilidade</i>	44
Inibição do crescimento por difusão em poço	44
Análise da associação de BPF com NP frente a <i>E. coli</i>	45
Análise da associação de BPF com NP frente a <i>S. aureus</i>	50
Ensaio antimicrobianos em disco difusão em ágar	54
<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição e concentração bactericida mínima (CBM)</i>	55
6 DISCUSSÃO	56
Comparação entre método disco-difusão e microdiluição	59
7 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Os selantes de fibrina também conhecidos como cola de fibrina, adesivos de fibrina ou biopolímero de fibrina (BPF), são matrizes biológicas do plasma humano, totalmente reabsorvíveis, que mimetizam os últimos estágios da cascata de coagulação durante o qual o fibrinogênio é convertido em um coágulo de fibrina estruturado e insolúvel (ALVING et al., 1995; MARTINOWITZ; SPOTNITZ, 1997). O selante de fibrina geralmente consiste em dois componentes principais, o fibrinogênio derivado de humano em uma solução altamente concentrada com fator XIII e outras proteínas plasmáticas e o segundo é uma combinação de trombina bovina e cloreto de cálcio. Quando as duas soluções são misturadas, trombina converte fibrinogênio em monômeros de fibrina. A ativação simultânea do fator XIII pela trombina na presença de cálcio ionizado estabiliza a ligação de monômeros de fibrina aumentando a resistência à tração do coágulo (BRENNAN, 1991; SIERRA, 1993). Um agente antifibrinolítico, como aprotinina, um inibidor de protease de ocorrência natural, pode ser adicionado a qualquer componente do selante de fibrina para atrasar a lise do coágulo em áreas com alta atividade fibrinolítica local (MATRAS, 1985).

O biopolímero de fibrina pode ser sintetizado de quatro maneiras: Sintético, Autólogo, Homólogo e Heterólogo (FATTAHI et al., 2004; LE GUÉHENNEC et al., 2004; BARROS et al., 2009; MEHDIZADEH et al., 2013). Os adesivos autólogos usando fibrinogênio do próprio paciente não apresentam riscos de transmissão de doenças infecciosas e reações alérgicas, porém em cirurgias de emergências são inviáveis, somente usados em procedimentos cirúrgicos eletivos e programados. Como alternativa tem sido utilizado o adesivo homólogo, o qual é previamente analisado e preparado, mas por ser de origem humana pode trazer riscos através de frações de sangue transmitindo doenças, como parvo vírus, HIV e hepatite (HINO et al., 2000), além disso o paciente tem a possibilidade de desenvolver anticorpos contra a trombina bovina. (BARROS et al., 2009). Os selantes de fibrina sintético são de alto custo, como por exemplo, os adesivos à base de cianoacrilato, que não são biodegradáveis e podem induzir uma resposta inflamatória significativa pela sua natureza hidrofóbica (BUCKLEY et al., 2010), necrose do tecido ou fibrose extensa (RADOSEVICH et al., 1997).

Visando superar tais problemas, a Universidade Estadual Paulista de Botucatu em 1989, no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), a partir da mistura de gioxina uma enzima extraída do veneno da cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) e um crioprecipitado de sangue de búfalo (*Bubalus bubalis*) rico em fibrinogênio (BUCHAIM et al., 2016), desenvolveram um novo selante de fibrina heterólogo (Figura 01).

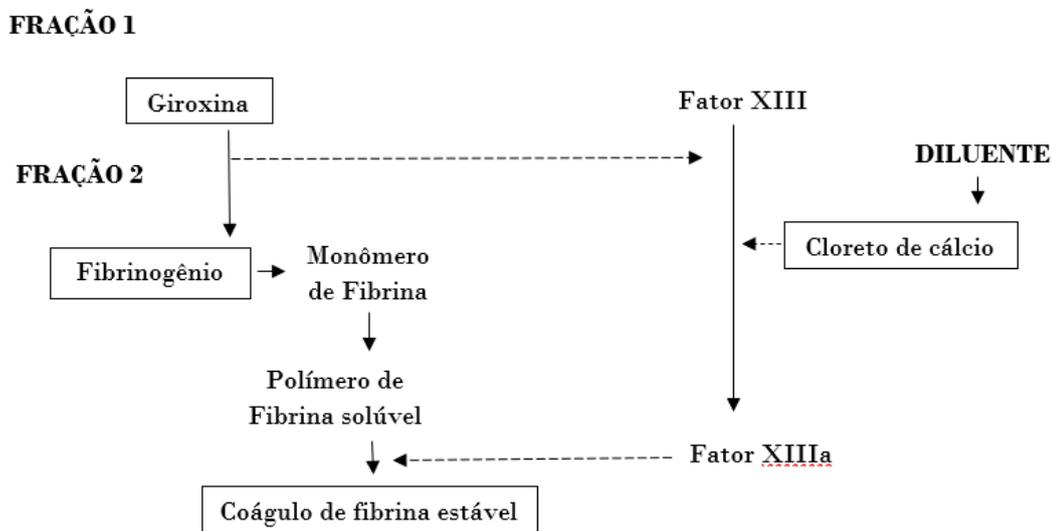
Figura 1 - Selante de Fibrina Heterólogo produzido pelo CEVAP



Fonte: Autoria própria.

Seus componentes ativos imitam o passo final da cascata de coagulação, uma enzima semelhante a trombina atua sobre a molécula de fibrinogênio convertendo em monômero de fibrina, que por sua vez polimeriza na presença de cálcio formando um coágulo estável (Figura 2). O BPF tem baixo custo de produção, não possui reações adversas, tem boa capacidade adesiva, efeito hemostático, não transmite doenças infecciosas por não conter sangue humano, é um produto biológico e biodegradável (FERREIRA, et al., 2017) que vem sendo testado com sucesso em animais e humanos.

Figura 2 - Eventos que ocorrem com o biopolímero de fibrina derivado de veneno de *Crotalus durissus terrificus* e fibrinogênio de *Bubalus bubalis* imitando o final da cascata de coagulação



Fonte: Autoria própria - adaptada de Barros et al., 2009.

De acordo com BARROS et al. (2015) o selante de fibrina heterólogo pode ser utilizado como arcabouço para vários tipos de células permitindo a proliferação, migração e diferenciação celular, e pode servir como uma estrutura biológica eficaz na capacidade de entrega de droga e com resultado para uma variedade de medicamentos (GRECO et al., 1991).

Uma emergência de saúde atualmente é a utilização excessiva de antibióticos causando o surgimento de estirpes de bactérias resistentes aos fármacos convencionais (FRIERIA et al., 2017). O principal interesse na utilização de agentes antimicrobianos com prata está associado ao aumento no número de bactérias resistentes aos antibióticos. As bactérias apresentam baixa propensão de desenvolverem resistência contra a prata, considerando o seu amplo modo de ação. Além disso, a toxicidade para células humanas é considerada baixa quando comparada à toxicidade em relação às bactérias (CHAGHABY et al., 2011).

BPF desenvolvido a partir do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, apresenta uma excelente alternativa para a engenharia de tecidos e

modulação celular. Muitos estudos (Tabela 1) têm sido realizados na procura de testar os possíveis usos e grau de segurança do BPF. Entre eles podemos citar, seu uso como cicatrizante de úlceras venosas em membros inferiores que demonstrou ser seguro e com potencial eficácia em um estudo clínico de fase I/II. A associação com nitrato de prata (NP) permitirá seu uso em feridas contaminadas e colonizadas, o que atualmente leva a suspensão do tratamento com o BPF.

2 OBJETIVOS

Investigar o efeito antimicrobiano da associação do biopolímero de fibrina com o nitrato de prata

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação *in vitro* de diferentes concentrações de nitrato de prata associadas ao biopolímero de fibrina frente a microrganismos gram positivo e gram negativo.
- Determinar o espectro de ação antimicrobiana, a concentração inibitória mínima (CIM), e a concentração bactericida mínima (CBM).

3 REVISÃO DA LITERATURA

BIOPOLÍMERO DE FRIBRINA

Cola de fibrina um aspecto histórico

O selante de fibrina baseia-se na reprodução do estágio final da cascata da coagulação, onde o fibrinogênio é segmentado em monômeros de fibrina, pela ação da trombina. Os monômeros de fibrina formam ligações cruzadas entre si pela ação do fator XIII e íon cálcio, sofrendo polimerização, formando os coágulos estáveis. O coágulo de fibrina adere ao tecido e possui capacidades hemostáticas e adesivas (SPOTNITZ W D, 2010).

O uso de compostos de fibrina como agente hemostático ocorreu pela primeira vez na Alemanha em 1909, quando BERGEL relatou o efeito hemostático do pó de fibrina em ferimentos. Em 1911 CUSHING usou fragmentos de coágulos solidificados para hemostasia. GREY realizou experimentos para conter o sangramento de lacerações cutâneas e cerebrais em animais domésticos usando fibrina extraída de sangue ovino. HARVEY converteu fibrina bovina num material hemostático e testou no reparo de feridas e em anastomoses intestinais (MATRAS, 1985; HOLCOMB, 1997). YOUNG e MEDAWAR (1940) realizam anastomoses de nervos periféricos com fibrinogênio em caráter experimental. Em 1944 CRONKITE et al e TEDRICK et al combinaram o fibrinogênio com a trombina pela primeira vez para fixação de enxerto de pele. No entanto na década de 70 com o desenvolvimento de técnicas de microcirurgia a cola de fibrina ganhou nova importância e com os avanços na pesquisa tornando possível o isolamento dos fatores de coagulação podendo aumentar a concentração do fibrinogênio e adicionar o fator XIII que estabiliza a ligação de monômeros de fibrina aumentando a resistência à tração do coágulo (MATRAS, 1985). Desde então a cola de fibrina passou a ser empregada em estudos experimentais e clínicos com as mais variadas aplicações.

Biopolímero de fibrina obtido a partir de veneno de serpente

O biopolímero de fibrina pode ser sintetizado de quatro maneiras: Sintético, Autólogo, Homólogo e Heterólogo (FATTAHI et al., 2004; LE GUÉHENNEC et al., 2004; MEHDIZADEH et al., 2013; BARROS et al., 2009). Os adesivos autólogos usando fibrinogênio do próprio paciente não apresentam riscos de transmissão de doenças infecciosas e reações alérgicas, porém em cirurgias de emergências são inviáveis, usados somente em procedimentos cirúrgicos eletivos e programados. Como alternativa tem sido utilizado o adesivo homólogo, o qual é previamente analisado e preparado, mas por ser de origem humana pode trazer riscos através de frações de sangue transmitindo doenças, como parvovirus, HIV e hepatite (HINO et al., 2000), além disso o paciente tem a possibilidade de desenvolver anticorpos contra a trombina bovina (BARROS et al., 2009). Os selantes de fibrina sintético são de alto custo, como por exemplo, os adesivos à base de cianoacrilato, que não são biodegradáveis e podem induzir uma resposta inflamatória significativa pela sua natureza hidrofóbica (BUCKLEY et al., 2010), necrose do tecido ou fibrose extensa (RADOSEVICH et al., 1997).

Visando superar tais problemas, um grupo de pesquisadores brasileiros do Centro para o Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), desenvolveram um novo selante de fibrina heterólogo derivado do veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* (Figura 3) e um crioprecipitado de sangue de búfalos *Bubalus bubalis* rico em fibrinogênio (BUCHAIM et al., 2016; FERREIRA JR, et al., 2017).

Figura 3 - Ordenha do veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* para extração da serina protease



Fonte:<http://cevap.org.br/2018/04/25/biocurativo-de-sangue-de-bufalo-e-veneno-de-cascavel-ajuda-no-tratamento-de-ulceras/>O momento exato da retirada do veneno da serpente (Foto: Rogério Nascimento/Ed. Globo)

A peçonha das serpentes é composta por uma mistura complexa de componentes de diferente natureza bioquímica, com predominância de moléculas de caráter proteico geralmente com capacidade enzimática, o veneno crotálico contém basicamente enzimas, toxinas e peptídeos entre elas a giroxina uma serinoprotease que foi descrita como uma glicoproteína similar a trombina, responsável pela ação coagulante do veneno, transformando fibrinogênio em fibrina (BARROS et al., 2011; PIRKLE, 1998).

Os primeiros estudos experimentais foram realizados por Juan et al. (1995) utilizando selante de fibrina heterólogo produzido pelo CEVAP que observaram um bom nível de adesividade e propriedades hemostáticas no reparo de lesões nervosas em ratos. Estudos comparativo entre crioprecipitados de bubalinos, bovinos, ovinos e equinos realizados por THOMAZINI-SANTOS et al. (1998) indicaram que sangue de bubalino apresentou maior nível de fibrinogênio quando comparado aos outros, desde então o fibrinogênio humano foi substituído por este biomaterial na confecção do selante de fibrina após essa pesquisa. Eles também verificaram que os agentes antifibrinolítico não eram necessários para este selante para obter uma boa coaptação das bordas cirúrgicas da pele (THOMAZINI-SANTOS, 2001). A primeira aplicação deste novo selante em humanos foi realizada por STOLF et al. (1993) como alternativa à sutura convencional na região nasolabial e observou uma boa capacidade adesiva e de cicatrização deste material. Após essas pesquisas, vários estudos experimentais pioneiros foram realizados (Tabela 1) na procura de testar os possíveis usos e grau de segurança do selante de fibrina heterólogo, entre eles o uso para tratamento de úlceras venosas.

Tabela 1 – Estudos experimentais com Biopolímero de Fibrina

Autores	Título	Local de Aplicação BPF	Resultados
STOLF et al.,1993	Cola de fibrina derivada de veneno de cobra. Uso experimental em cirurgia dermatológica	Pele	Acelerar o processo de cicatrização
VITERBO et al., 1994	Reparação de nervo periférico com cola de fibrina feita com veneno de cobra e fibrinogênio de búfalo, cavalo, boi e humano	Nervo periférico	Diminui o infiltrado inflamatório
SARTORI et al., 1998	Use of fibrin glue derived from snake venom in testicular biopsy of rams	Testículo	Produziu rápida recuperação tecidual Mostrou-se de fácil aplicação Melhor estética do que a sutura com náilon
THOMAZINI-SANTOS I A, 2000	Adesivo de fibrina derivado de veneno de serpente: efeito da adição do ácido epsilon-aminocapróico, do ácido tranexâmico e da aprotinina na coaptação das bordas cirúrgicas em incisões de pele de ratos	Pele	Produziu rápida recuperação tecidual Reduziu o acompanhamento pós-operatório Diminui o edema na fase exsudativa Facilitou a evolução da fase proliferativa e de maturação da cicatrização
LEITE et al., 2000	An evaluation by rat colon anastomosis of the efficacy of fibrin glue derived from snake venom	Intestino	Permitiu a coaptação de segmentos intestinais Teve um efeito hemostático eficiente Mostrou-se eficiente em permitir a anastomose do colón de ratos.
RAHAL et al., 2003	Effect of fibrin glue derived from snake venom on the viability of autogenous split-thickness skin graft	Pele	Produziu rápida recuperação tecidual Aumentou a sobrevida do enxerto autógeno de pele de espessura parcial e uma adesividade moderada Acelerou o processo de cicatrização
MORAES et al., 2004	Experimental use of fibrin glue derived from snake venom in non-pregnant canine uterus	Útero	Produziu rápida recuperação tecidual Reduziu o acompanhamento pós-operatório Diminuiu o edema na fase exsudativa da inflamação e facilitou a evolução das fases de proliferação e maturação

Continuação Tabela 1

FERRARO et al., 2005	Clinical and morphological evaluation of snake venom derived fibrin glue on the tendon healing in dogs	Tendão	Evitou a formação excessiva de aderências Inibiu a migração de células inflamatórias Facilitou as etapas de maturação do processo de cicatrização tendínea.
BARBOSA et al., 2007	Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery	Cirurgia periodontal	Promoveu a maturação do enxerto gengival Acelerou o processo de cicatrização
SAMPAIO et al., 2007	Use of fibrin glue derived from snake venom in the repair of deep corneal ulcers – experimental study in dogs	Úlcera de córnea	Prevenindo a formação de edema na ferida Acelerou o processo de cicatrização Simples aplicação Evitou formação de edema na ferida
GATTI et al., 2011	Treatment of venous ulcers with fibrin sealant derived from snake venom	Úlcera venosa	Diminuiu o edema na fase exsudativa Facilitou a evolução da fase proliferativa e de maturação da cicatrização
CUNHA et al., 2015	Hydroxyapatite and a New Fibrin Sealant Derived from Snake Venom as Scaffold to Treatment of Cranial Defects in Rats	Crânio	Biocompatibilidade com tecido ósseo Crescimento ósseo favorável no local da lesão
BUCHAIN et al., 2016	The new heterologous fibrin sealant in combination with low-level laser therapy (LLLTT) in the repair of the buccalbranch of the facial nerve	Ramo no nervo facial	Permitiu a coaptação dos cotos sem trauma às fibras nervosas
CASSARO et al., 2019	Fibrin biopolymer as scaffold candidate to treat bone defects in rats		Facilidade de aplicação Otimiza os procedimentos cirúrgicos Permitiu a adesão e proliferação celular
LEITE et al., 2019	Heterologous fibrin sealant potentiates axonal regeneration after peripheral nerve injury with reduction in the number of suture points	Nervo periférico	Acelerou a prática cirúrgica Restabeleceu o impulse nervosa
ROSSO et al., 2020	Photobiomodulation Therapy Associated with Heterologous Fibrin Biopolymer and Bovine Bone Matrix Helps to Reconstruct Long Bones	Osso Longo	Crescimento ósseo aumentado Proliferação celular Inflamação reduzida Aumento da densidade mineral óssea com calcitonina

Fonte: Aatoria própria

Depois de testado por vários modelos de experimentação animal, este produto foi patenteado e fabricado pelo CEVAP (Figura 4), e aprovado junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para uso em ensaios clínicos fase I/II no tratamento de úlceras venosas crônicas em seres humanos, para avaliar a segurança, eficácia e confirmar a menor dose utilizada.

Figura 4 - Selante de Fibrina derivado de veneno de serpente e de sangue de búfalo produzido pelo CEVAP



Fonte: Imagem do site da Unesp disponível em: <http://unesp.ciencia.com.br/2017/09/01/capa-medicina-89/> Acesso em: 07 fev. 2021.

NITRATO DE PRATA

Prata: um aspecto histórico

Parece que o primeiro relato do uso da prata como moeda remonta o período pré-dinástico no Egito antigo (3500 aC). Desde 1000 aC os efeitos antimicrobiano da prata já vinha sendo explorado mesmo que empiricamente, quando vasos de prata eram usados para manter a água potável. Alexandre, o Grande (335 aC) foi aconselhado por Aristóteles para armazenar água fervida em vasos de prata para levar em suas campanhas militares (RUSSELL, 1994).

RAVELIN (1869) foi o primeiro a descrever a ação antimicrobiana da prata mesmo em concentrações extremamente baixas. Von NAEGELI, determinou seu efeito bactericida contra proliferação de algas. Em 1881, o Doutor CARL SIEGMUND FRANZ CREDE, obstetra alemão foi pioneiro no tratamento de infecções oculares em neonatos com solução de nitrato de prata, técnica largamente utilizada desde então. Em 1895 HALSTED um cirurgião norte americano, defendeu o uso da prata como curativos e sutura para incisão cirúrgica e durante a Primeira Guerra (1914-1918), foram usadas para prevenir e tratar infecções (ALEXANDER, 2008).

A atividade antimicrobiana do íon prata é conhecida desde a antiguidade, e seu espectro é bastante amplo e encontrou uma variedade de aplicações (CLEMENT et al., 1994). Diluições de soluções de nitrato de prata foram usadas no tratamento de infecções e sais simples de prata dão origem a altas concentrações de íons de prata na solução que é precipitada por cloreto e proteínas, causando efeitos adstringentes, diminuindo o efeito bactericida. Tratamento a longo prazo ou quantidades excessivas de compostos de prata podem causar argiria, a deposição de prata na pele e outros tecidos ocasionando uma coloração cinza irreversível e alteração eletrolíticas que precisavam ser tratadas com cálcio, sódio e potássio suplementares quando usados como quimioprofilaxia tópica das queimaduras (RICKETTS, 1970). Isso levou FOX (1968) a desenvolver sulfadiazina de prata (AgSD), um sal insolúvel em água que se dissolve apenas lentamente em fluidos biológicos, que se tornou um dos principais agentes tópicos usados em queimaduras (DUNN, 2004). O nitrato de prata, tem sido utilizado durante séculos como agente antimicrobiano, mas seu uso diminuiu drasticamente quando os antibióticos foram introduzidos nas práticas médicas (ATIYEH et al., 2007), ficando quase que exclusivo a sua utilização para tratamento e prevenção de infecções de queimaduras e feridas de difícil tratamento. Entretanto o uso de prata sob a forma de sais e nanopartículas ganhou interesse na comunidade científica devido às suas propriedades bactericidas contra organismos resistentes a múltiplos fármacos que conseguem suportar antibioticoterapia convencional (MASCHARAK et al., 2016).

A prata e sua ação bactericida e toxicidade

O conhecimento dos mecanismos de ação de diversos agentes antimicrobianos desempenha um papel importante no combate aos microrganismos. A atividade biológica da prata tem sido atribuída a liberação contínua de quantidades vestigiais de cátions (Ag^+), que são tóxicos para o microrganismo (LIU et al., 2010) e tem sido demonstrado que em baixas concentrações, a prata não é tóxica para células humanas (PAL et al., 2007). A prata quando comparada com outros metais exibe alta toxicidade para microrganismos e baixa toxicidade para células de mamíferos (ZHAO; STEVENS, 1998). Segundo LANSDOWN (2010) a prata é amplamente usada em curativos e dispositivos médicos como um antibiótico de amplo espectro contra organismos gram-positivos e gram-negativos (MIRAFTAB et al., 2014) e atividade antifúngica (BOWLER et al., 2005; BALAZS et al., 2004), mesmo apresentando aplicações benéficas, existe um debate sobre a sua toxicidade (HERMANS, 2006).

Foram estabelecidos vários mecanismos moleculares básicos de sua ação, os íons Ag^+ apresentam tendência em complexar com substâncias contendo enxofre ou fósforo (PAL et al., 2007), entre elas as proteínas que contêm enxofre, elementos que contêm fósforo como o DNA, bem como interrompe processos bioquímicos, tem forte interação com os grupos tiol (sulfidril, SH) das proteínas dos microrganismos, interagindo com NADH desidrogenase, e interrompe a cadeia respiratória bacteriana gerando espécies reativas de oxigênio, que podem levar ao stress oxidativo e danos celulares (HOLT et al., 2005; CHERNOUSOVA et al., 2013).

Seu efeito inibitório está associado à sua adsorção à parede celular carregada negativamente e desativação de enzimas celulares, com comprometimento da permeabilidade da membrana (PERCIVAL et al., 2005).

A prata tende a ionizar na presença da umidade, secreções e fluidos corporais e libera Ag^+ que são biologicamente ativos com uma forte afinidade por grupos sulfidril e outros aniônicos ligantes de proteínas (LANSDOWN, 2010). Vários fatores influenciam a atividade antimicrobiana dos sais de prata, que tem uma tendência acentuada de se adsorver às superfícies, os íons liberados precipitam com ânions de cloretos e fosfatos ou fazem ligação na forma

de complexos inertes com albuminas, estes íons não ficam disponíveis para atividade antimicrobiana (RUSSELL, 1994; SCHIERHOLZ et al., 1999). Estudos clínicos com curativos antibióticos têm mostrado que a maior parte dos Ag⁺ liberado no leito da ferida é depositado superficialmente e que níveis mínimos estão disponíveis para absorção (KARLSMARK et al., 2003).

Apesar do amplo uso de formulações contendo íons de prata, muitas dúvidas ainda permanecem sobre a sua toxicidade, que podem ocorrer em nível celular, a prata é internalizada por macrófagos e classificada no citoplasma e intracelular os íons de prata liberados interferem com funções mitocondriais e induzem a morte celular por apoptose (CERESA et al., 2019). No entanto, as células eucarióticas apresentam maior estrutura e funcionalidade do que as células procarióticas. Assim, uma concentração maior de íons (mais de 1,6 ppm de íons Ag⁺) são necessárias para alcançar efeitos tóxicos compatíveis em células eucarióticas do que em procarióticas (HIDALGO et al., 1998).

RICKETTS (1970) conduziu um experimento que avaliou a toxicidade da prata em microrganismo e em cultura de pele e verificou que solução de AgNO₃ em água entre 10⁵ e 10⁶ M teve um efeito bactericida e que a inibição da respiração da pele foi cerca de 25 vezes a concentração mínima de AgNO₃ que inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*.

HIDALGO et al. (1998) em uma avaliação *in vitro* observou em concentrações de 4,12 - 82,4 mM de AgNO₃ expostos por um período de 8 e 24 h, exercem efeitos citotóxicos em fibroblastos e células endoteliais. Os íons de prata inibiram a proliferação de fibroblastos e a exposição prolongada produziu perda celular dependente de Ag. Sendo a ação inibitória da síntese de DNA o principal evento citotóxico associada à perda significativa de proteína celular. A incorporação de soro fetal ao meio de cultura atenuou a citotoxicidade Ag⁺, a proteção máxima foi observada na concentração de 10% em situações próximas assemelhando-se a condições fisiológicas.

CERESA et al. (2019) testaram duas formulações salinas baseadas em lactato e sacarina enriquecidas com prata em uma gama de concentrações incorporados em microesferas de alginato ou colágeno avaliando os efeitos citotóxico em queratinócitos e fibroblastos, e observaram que a viabilidade celular começou a diminuir quando a prata foi usada em concentrações a partir de 7,5 mM.

Segundo WAKSHLAK et al. (2015) um novo fenômeno de atividade antibactericida dos íons de prata é prolongado através do chamado efeito zombie, onde bactérias mortas atuam como um reservatório de íons de prata que liberam lentamente esses íons, exercendo novamente a sua atividade bactericida (GLISIC et al., 2016) (Tabela 2).

Tabela 2 - Artigos selecionados para coleta de dados do estudo

Autor	Microrganismo	Parâmetros nitrato de prata	Resultados
RICKETTS et al., 1970	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Efeito nas células da pele	A solução de nitrato de prata 0 5% (3×10^{-2} M) Concentração baixa 10^{-1} M Concentrações inibitórias mínimas de nitrato de prata 20-40, ug/mL	Entre 10^{-5} e 10^{-6} Molar solução de nitrato de prata em água teve efeito bactericida. A quantidade mínima AgNO ₃ causando inibição da respiração da pele na cultura de tecido ficou cerca de 25 vezes a concentração mínima de AgNO ₃ que inibiu crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
FENG et al., 2000	<i>Escherichia coli</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>	10 mg/mL AgNO ₃	Os íons de prata interagem com os grupos tiol na proteína, que induzem a inativação da bactéria, moléculas de DNA se condensam e perdem suas habilidades de replicação
MATSUMURA et al., 2003	<i>E. coli</i>	As células foram tratadas com AgNO ₃ a 0,5; 1,0 e 2,0 mg/ mL	A atividade bactericida do nitrato de prata a 1 M foi comparável ao do zeólito de prata a 100 mg / L.
KALIMUTHU et al., 2008	<i>Bacillus licheniformis</i>	1mM de AgNO ₃ para sintetizar bionanopartículas	As nanopartículas de prata são sintetizadas pela biomassa da bactéria <i>B. licheniformis</i>
MIURA, 2009	Células <i>Epiteliais HeLa</i>	Citotóxico a 12 mg L^{-1} IC 50 a 17 mg L	NanoAg possui potencial para citotoxicidade em caso de exposição a altas concentrações. Apoptose está associada com morte celular. Ambos NanoAg e AgNO ₃ regulam para cima os níveis de expressão dos genes de estresse, ho1 e mt 2A

Continuação Tabela 2

PANDIAN et al., 2010	<i>Bacillus licheniformis</i>	1mM de AgNO ₃ síntese bionanopartículas. CIM 5mM de AgNO ₃ – morte celular	Mais baixa concentração induziu a síntese de nanopartículas, O MIC foi de 5 mM e induziu a produção de catalase, formação de corpos apoptóticos e fragmentação de DNA
SUN et al., 2011	<i>E.coli</i> ATCC 25923 e <i>S. aureus</i> ATCC 25922	A CIM de AgNO ₃ foi de 336 µg mL FFD para <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	Todos os filmes revelaram efeitos bacteriostáticos, e aqueles com concentrações de AgNO ₃ superiores a 336 µg / mL teve efeitos bactericidas
GREULICH et al., 2012	<i>Echerichia coli</i> DH5a <i>Staphylococcus aureus</i> Células tronco mesenquimais (humanas) Células T (humanas)	Concentrações finais para os testes bacterianos com nanopartículas foram 50, 40, 30, 25, 20 e 12,5 ppm e para íons de prata 10, 7,5; 5; 3,5; 2,5; 1,25 e 1,0 ppm. Culturas de células com nanopartícula 50, 30, 20, 10 e 5 ppm e para ions de prata 5; 2,5; 1,5; 1,0 e 0,5 ppm	Íons de prata (como acetato de prata) e polivinilpirrolidona (PVP) nanopartículas de prata estabilizadas (70 nm) mostraram que o efeito tóxico da prata ocorre de forma semelhante de concentração para <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs), e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), ou seja, 0,5 a 5 ppm para íons de prata e 12,5 a 50 ppm para nanopartículas de prata
FERNANDES, 2014	<i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> <i>B. cereus</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. coli</i> <i>S. Typhimurium</i>	Concentração da difusão em ágar 50 µg·mL ⁻¹ Concentração da diluição seriada AgNO ₃ variou 0,098 µg·mL ⁻¹ a 50 µg·mL ⁻¹	Gram-negativas foram mais sensíveis às Ag-NPC e ao AgNO ₃ do que as gram-positivas. As Ag-NPC e o AgNO ₃ perderam a atividade antimicrobiana na presença de substâncias antioxidantes, sugerindo o envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ERO). A atividade antimicrobiana das Ag-NPC e do AgNO ₃ foi reduzida em meio de cultura comparado com suas atividades em água, provavelmente, pela complexação das Ag-NPC ou do AgNO ₃ com os constituintes do meio, como enxofre e fosfatos.

Continuação Tabela 2

WIEGAND et al., 2015	<i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,1; 1; 10; 100 (µg/ml) Silver nitrate	<i>S. aureus</i> exibiu uma sensibilidade crescente contra nitrato de prata com aumento do pH, enquanto o efeito sobre <i>P. aeruginosa</i> foi encontrado ser nitidamente diminuído.
VASHCHENKO et al., 2015	modelos de membranas lipídicas	soluções aquosas de AgNO ₃ em uma ampla faixa de concentração (até 30% em peso) 0,11 a 4,09 M	Foi mostrado que a presença de AgNO ₃ leva a um aumento na temperatura de transição de fase principal (T _m) do multibilização na camada L _α dipalmitoilfosfatidilcolí e o aparecimento de um pico de transição de fase adicional, sugerindo um aumento na densidade e heterogeneidade da bicamada lipídica.
HADRUP et al., 2018	Mucosas e pele	A pele intacta representa uma barreira eficaz contra a absorção de prata. Observou-se que superfícies mucosas são barreiras menos eficazes e pele comprometida costuma ser uma barreira insatisfatória	Observou-se que a prata tem um baixo potencial para irritação da pele, essas descobertas sugerem que efeitos críticos começam a ocorrer em doses acumulativas na faixa de 60 a 70 mg de prata/kg de peso corporal.
YU et al., 2018	<i>Bacillus subtilis</i>	sulfonamidas (SAs) e agentes antibacterianos de prata (AgNO ₃) e nanop prata (AgNP, 5 nm) Silver nitrate/AgNO ₃ 4.92 mol/L Nano-silver/AgNP 5 nm, 5.07 mol/L	A toxicidades de SAs e agentes antibacterianos de prata foram significativamente superiores aos dos QSIs. No teste de toxicidade da mistura, AgNO ₃ / AgNP apresentou efeitos sinérgicos e aditivos com QSIs, mas efeitos aditivos e antagônicos com SAs, enquanto os QSIs exibiram sinergia, efeitos aditivos e antagônicos com SAs, bem como osmisturas de QSIs e AgNO ₃ / AgNP e SAs

Continuação Tabela 2

FREIRE et al., 2018	<i>Aeromonas</i> spp	CIM AgNO ³ obtendo-se concentrações finais de 84,5; 42,25; 21,12; 10,56; 5,28; 2,64; 1,32; 0,66 µg/mL.	o nitrato de prata inativou o crescimento dos isolados nas concentrações bactericidas mínimas de 2,64 µg/mL para um isolado (P2.2) e de 5,28 µg/mL para os demais para causar a morte das bactérias inseridas no biofilme consolidado, a concentração ideal seria 1.000 vezes maior do que nas células planctônicas
OLIVEIRA et al., 2018	contra o bloqueio neuromuscular, efeitos miotóxicos induzidos por Veneno de Bothrops jararacussu contra células procarióticas	AgNPs ~50nm (0.081mg mL ⁻¹) Veneno de Bothrops jararacussu (60 mg mL ⁻¹)	AgNPs e veneno foi o suficiente para abolir os efeitos tóxicos do veneno de B. jararacussu, mas as células de mamíferos eram altamente sensíveis a AgNPs mais do que células procarióticas
MILANOWSKI, 2019	<i>H. alvei</i> , <i>P. luteola</i> and <i>S. warneri</i>	Solução de AgNO ₃ nas concentrações: 250; 125; 62,5 31,25; 15,625 µg mL ⁻¹	Entre os bacterianos voláteis, hidrocarbonetos, cetonas e álcoois apareceram como os grupos químicos mais prevalentes, que podem estar associados com as vias de síntese de ácido. Para esses grupos de compostos, observamos tendências de aumento e diminuição de VOCs após a suplementação de AgNO ₃ . A presença de prata levava à emissão de compostos não observados antes, que poderiam estar principalmente associados à degradação da membrana bacteriana
MEDEIROS, 2019	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Massa de Ag (g) para cada filme NC: 0,001079; 0,001618; 0,002157; 0,002697; 0,003236; 0,004315; 0,005394	Nanopartículas com tamanho compreendido entre 35 e 50 nm apresentaram resultados de halo de inibição médio de 19 mm para <i>P. aeruginosa</i> e 18 mm para <i>S. aureus</i> , enquanto AgNPs com tamanho médio entre 60 e 80 nm apresentaram valores de 17 mm e 13 mm, respectivamente

Fonte: Autoria própria.

4 MATERIAL E MÉTODOS

BIOPOLÍMERO DE FIBRINA (BPF): O BPF derivado de peçonha de serpente foi gentilmente fornecido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) cujos componentes e fórmula de aplicação constam em seus pedidos de patentes (Números do registro: BR1020140114327 e BR1020140114360). No momento do uso os componentes da fração 1, fração 2 e diluente (Tabela 3) foram previamente descongelados, reconstituídos, misturados e aplicados de acordo com o protocolo deste estudo.

Tabela 3- Formulação do biopolímero de fibrina

Formulação Biopolímero de Fibrina	
Fração 1	Giroxina (Trombina)
Fração 2	Fibrinogênio
Diluente	Cloreto de cálcio

Fonte: Autoria própria.

INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO POR DIFUSÃO EM ÁGAR

Preparo das soluções antimicrobiana

O AgNO_3 (NP) em diferentes concentrações e associado ao BPF (Tabela 4) conforme descrito abaixo, serão testados em culturas de bactérias gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25992 e gram-positiva *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923.

Tabela 4 – Concentrações do AgNO_3 e associação do Biopolímero de fibrina com AgNO_3

Soluções de AgNO_3		Associação BPF+NP	
NP1	1mg/mL	BPF+ NP1	1mg/mL
NP2	2,5 mg/mL	BPF+ NP2	2,5 mg/mL
NP3	5mg/mL	BPF+ NP3	5mg/mL

Fonte: Autoria própria.

Associação do BPF+ NP:

O BPF é composto por 2 componentes ativos: a fração 1, fração 2 e um diluente que foram descongelados e misturados somente no momento do uso, seguindo as instruções do fabricante. O conteúdo da fração 1 foi misturado ao diluente e acrescentado as diferentes concentrações de NP conforme Tabela 3. Em microplaca de 96 poços foi pipetado 20µL desta mistura em poços previamente marcados para cada concentração e depois 20µL da fração 2 foi acrescentado nos mesmos poços, aguardou-se 15 minutos para polimerização.

Determinação do espectro de ação

O espectro de ação antimicrobiana foi determinado pela técnica da inibição do crescimento microbiano por difusão em ágar de acordo com a metodologia descrita M2-A8 – Normas de Padronização dos Testes de Sensibilidade Disco-Difusão para Antimicrobianos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2003, com modificações.

O ágar Müeller-Hinton da Sigma-Aldrich foi preparado conforme as instruções do fabricante. Imediatamente após a esterilização a 121° C, por 15 minutos, o meio foi resfriado e 25 mL foram distribuídos em placas de Petri, para garantir uma profundidade uniforme de aproximadamente 4 mm.

Preparo do inóculo

Para a ativação das bactérias, 100 µL da solução estoque de *S. aureus* e *E. coli* cedido pelo laboratório de microbiologia do Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, foram inoculados em 10 mL de caldo BHI (Infusão de Cérebro e Coração) da Kasvi e levados para estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Em seguida as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 3500 RPM por 5 minutos na Centrifuga Refrigerada SL – 706 – SOLAB. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas por três vezes com solução salina com fosfato (PBS) estéril da LCG Biotecnologia, até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$

UFC/mL) (Figura 5). O inóculo foi preparado fazendo-se suspensão direta do *pellet* obtido, em solução salina.

Figura 5 - Comparação da turbidez da suspensão bacteriana com número 0,5 da escala McFarland



Fonte: Autoria própria.

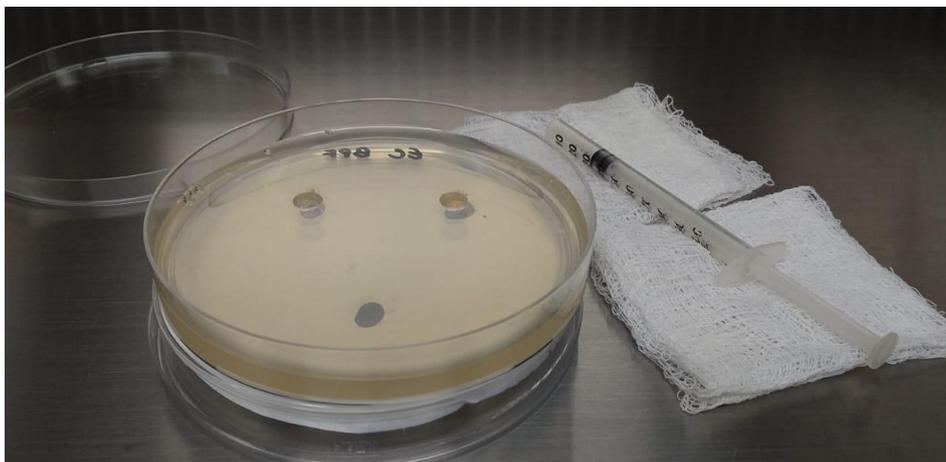
Inoculação das placas

Um *swab* de algodão estéril foi imerso na suspensão do inóculo preparada anteriormente até 15 minutos após ajustar a turbidez. O *swab* foi girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido, para retirar o excesso de inóculo.

A superfície do ágar Müller-Hinton foi inoculada passando-se o *swab* em toda a superfície do ágar estéril em cada placa. O procedimento foi repetido outras duas vezes, girando a placa, aproximadamente, 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, o *swab* foi passado na margem da placa contendo o meio de cultura.

Após um período de 15 minutos da inoculação poços 5 mm de diâmetro foram marcados em cada placa, e com o auxílio de uma seringa de 1mL adaptada os poços foram perfurados (Figura 6).

Figura 6 - Perfuração dos poços no ágar com seringa de 1mL adaptada

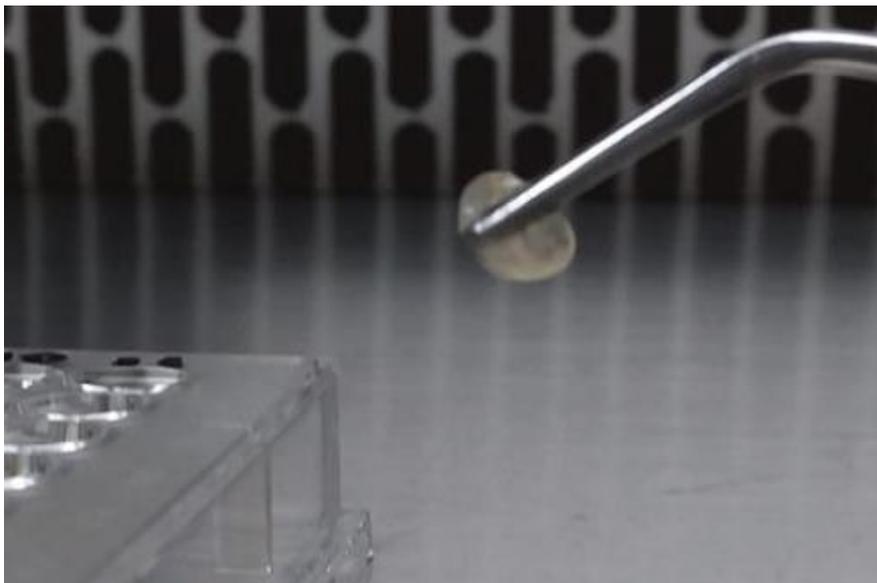


Fonte: A autoria própria.

Ensaio antimicrobiano poço difusão em ágar e leitura dos resultados

Após o preparo das placas e a sua inoculação com as suspensões bacterianas, os poços foram preenchidos com 40 μ L das soluções de NP em todas as concentrações testadas e os coágulos formados da associação do BPF com o NP foram retirados da microplaca com o auxílio de pinça estéril e inseridos nos poços do ágar (Figura 7). Aguardou-se tempo de evaporação das soluções e após as placas foram incubadas a 37°C, por 20h em estufa, e mensurado o halo de inibição presente em cada uma das placas testadas com uma régua milimetrada (Figura 8). Todos os grupos foram feitos em triplicata.

Figura 7 - Coágulo de BPF associado com NP



Fonte: Autoria própria.

Figura 8 - Determinação dos halos de inibição frente aos microrganismos e tratamentos testados



Fonte: Autoria própria.

Ensaio antimicrobianos em disco difusão em ágar

A técnica de difusão em disco foi realizada como controle positivo utilizando o método padrão recomendado pelo Comitê Nacional de Laboratório Clínico (NCCLS) documento M2-A8 – Norma aprovada- Oitava Edição. Para realização do teste de disco difusão foram utilizadas cepas de referência

Escherichia coli ATCC® 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 e discos de 10 mcg Amoxicilina, 5 mcg Ciprofloxacino e 1µg Oxacilina. Placas de Petri previamente preparadas foram inoculadas como descrito anteriormente e após um período de 15 minutos, os discos foram aplicados na superfície do ágar. As placas foram incubadas a 37° C por 20h em atmosfera ambiente (CLSI, 2003).

Os diâmetros em milímetros dos halos (Figura 9) foram medidos com auxílio de régua milimetrada. Todos os grupos foram feitos em triplicata.

Figura 9 - Halo formado no ensaio de disco difusão frente ao microrganismo *S. aureus* com disco contendo Oxacilina 1 µg medido em milímetros



Fonte: Autoria própria.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Preparo das diluições na microplaca

Um volume de 50µL de meio de cultura BHI (Infusão Cérebro e Coração) foi aplicado em todos os poços da microplaca, exceto na coluna 1 onde foi acrescentado 100µL das soluções de AgNO₃ (NP) e 100µL da associação do BPF+ NP. Com uma pipeta automática, a diluição seriada foi realizada pipetando 50 µL do primeiro poço da linha A (A1) para o segundo poço da linha A (A2). A

mistura foi homogeneizada e em seguida foi pipetado 50 µL do poço A2 para o A3. Este procedimento foi realizado até o poço A11, tendo este um volume final de 100 µL, o qual foi designado como controle de esterilidade (não foi acrescentada a suspensão bacteriana neste poço, com a finalidade de verificar a possível ocorrência de contaminação durante a diluição do antimicrobiano). O último poço de cada linha (A12-H12) foi utilizado como controle de crescimento bacteriano, ou seja, foi inoculado 50 µL de meio de cultura mais 50 µL da suspensão bacteriana (diluída 1:100).

Preparo da suspensão bacteriana

Foi preparada uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) que foi diluída 1:100 em solução salina ($\sim 5 \times 10^6$ UFC/mL), conforme recomenda normas de diluição.

Inoculação da suspensão bacteriana

Foi adicionado 50 µL da suspensão bactéria diluída nos poços 1 a 10 e no poço 12 de todas as linhas (A a H). Após o preparo das diluições, a inoculação foi realizada num intervalo máximo de 30 minutos. Após a semeadura, as placas foram tampadas e incubadas a 37 °C por 18h em atmosfera ambiente.

A associação do BPF+NP e controles avaliados foram diluídos de maneira seriada, resultando em painel de microdiluição na faixa de 1:4 a 1:1024, em BHI, acrescidos de suspensões microbianas com 10^6 UFC/mL em solução salina (PBS), segundo a metodologia do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), documento M07-A9 (2012). A concentração original de 1000 µg/mL para BPF+NP e NP resultaram em concentrações seriadas de 0,97µg/mL a 250µg/mL (Tabela 05).

Tabela 05 - Concentração original e concentrações após diluição seriada com BPF+NP e NP

Formulação	BPF+NP	NP
Concentração Original	1000µg/mL	1000µg/mL
	250 (1:4)	250 (1:4)
	125 (1:8)	125 (1:8)
	62,5 (1:16)	62,5 (1:16)
	31,2 (1:32)	31,2 (1:32)
Diluição seriada e concentrações alcançadas	15,62 (1:64)	15,62 (1:64)
	7,81 (1:128)	7,81 (1:128)
	3,9 (1:256)	3,9 (1:256)
	1,9 (1:512)	1,9 (1:512)
	0,97 (1:1024)	0,97 (1:1024)

Fonte: Aatoria própria.

Parâmetros para determinação das CIMs e CBMs

Após a incubação da diluição todos os poços foram plaqueados em ágar Muller Hinton e incubados por 20h. Foi realizada a leitura visual das placas com luz refletida, para observar a presença ou ausência de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a concentração mais baixa associada a visível crescimento (<250 UFC/mL). A CBM foi a menor concentração com ausência total de crescimento. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Análise estatística

Foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk com cada grupo. Caso não paramétrico (pelo menos um grupo não passou em teste de normalidade):

- Quando analisamos dois grupos, utilizamos o teste não paramétrico de Mann Whitney.
- Quando analisamos mais de dois grupos, utilizamos o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para múltiplas comparações.

Caso paramétrico (todos os grupos passaram em teste de normalidade):

- Quando analisamos dois grupos, utilizamos o teste t Student não-pareado.
- Quando analisamos mais de dois grupos, utilizamos o teste Anova de uma via com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações.

Utilizamos gráficos de caixa (boxplot) onde as barras representam o percentil 5-95% para a representação dos dados.

Para todos os casos consideramos diferenças significativas valores de $p < 0,05$

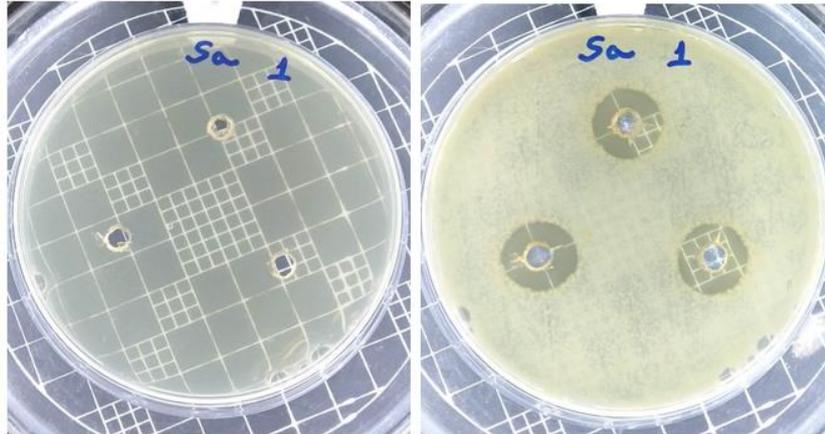
5 RESULTADOS

PERFIL DE SENSIBILIDADE

Inibição do crescimento por difusão em poço

Foram utilizadas várias concentrações de NP com BPF derivado de veneno de serpente frente aos microrganismos *E. coli* e *S. aureus*. Constatou-se por meio do teste de inibição do crescimento microbiano por difusão em ágar que tanto o BPF+NP quanto NP apresentaram um espectro de ação com atividade antimicrobiana sobre as bactérias gram-positivas (Figura 10) e gram-negativas.

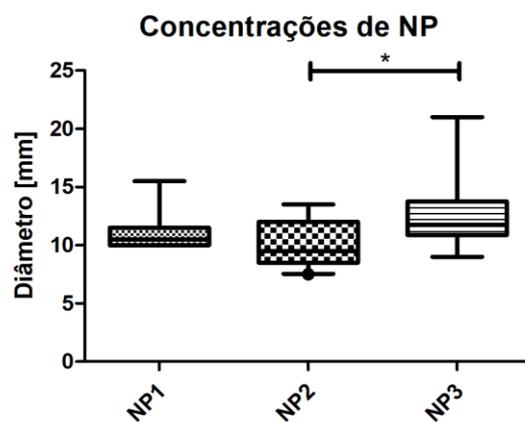
Figura 10 - Tratamento NP1 sobre *S. aureus* antes e depois da incubação a 37° C por 20h



Análise da associação de BPF com NP frente a *E. coli*

A figura 11 mostra as concentrações de NP e a inibição do crescimento da *E. coli*. Observa-se que houve diferença ($*p<0,05$) no diâmetro do halo de inibição tratado com a concentração de NP3 quando comparado com a concentração NP2.

Figura 11 - Diâmetro dos halos de inibição nas diversas concentrações de NP: a concentração de NP3 foi estatisticamente diferente da concentração NP2. (NP1 - 1mg/mL n= 11; NP2 - 2,5mg/mL n= 10; NP3 - 5mg/mL n= 10) ($*p<0,05$)



Constatou-se que não houve formação de halo de inibição (Figura 12) no teste do BPF isolado (Figura 13), não tendo efeito antibacteriano frente a *E. coli*.

Figura 12 - BFP isolado não promoveu halo de inibição frente a *E.coli* após 20h de incubação a 37° C

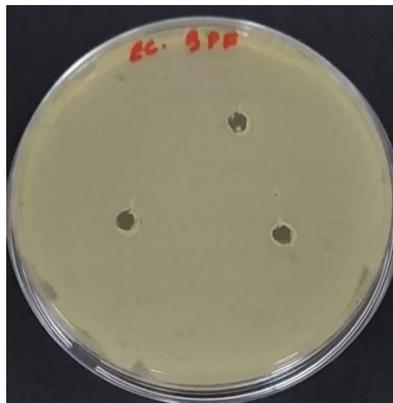
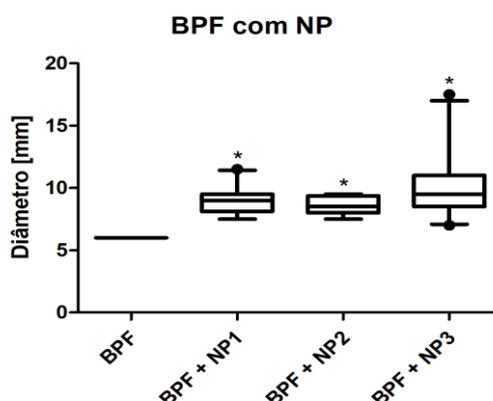


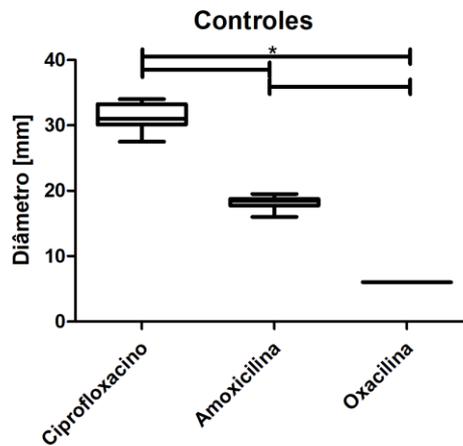
Figura 13 - Diâmetro dos halos de inibição nas diversas concentrações de NP com BPF: observa-se que somente o BPF (n= 9) não teve efeito antibacteriano sobre a *E. coli*, sendo estatisticamente diferente de BPF+NP1, BPF+NP2 e BPF+NP3 (* $p < 0,05$ comparado com BPF) (BPF1 - 1mg/mL n= 10; BPF2 - 2,5mg/mL n= 12; BPF3 - 5mg/mL n= 13)



Quando foram testados os antibióticos ciprofloxacino, amoxicilina, e oxacilina, observou-se inibição em diferentes graus, onde a ciprofloxacino foi mais eficaz em inibir o crescimento bacteriano. A *E. coli* não apresentou halo de inibição mostrou-se não sensível ao antibiótico oxacilina (Figura 14).

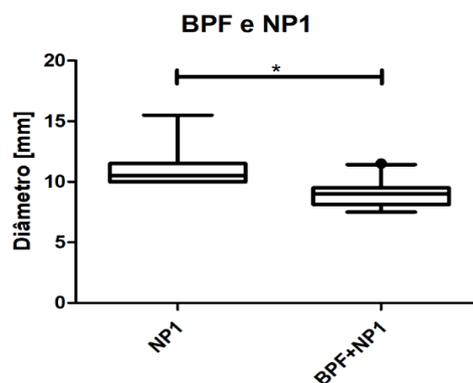
Figura 14 - Efeitos dos antibióticos sobre *E. coli*: os antibióticos testados ciprofloxacino e amoxicilina inibiram o crescimento de *E. coli* menos a oxacilina.

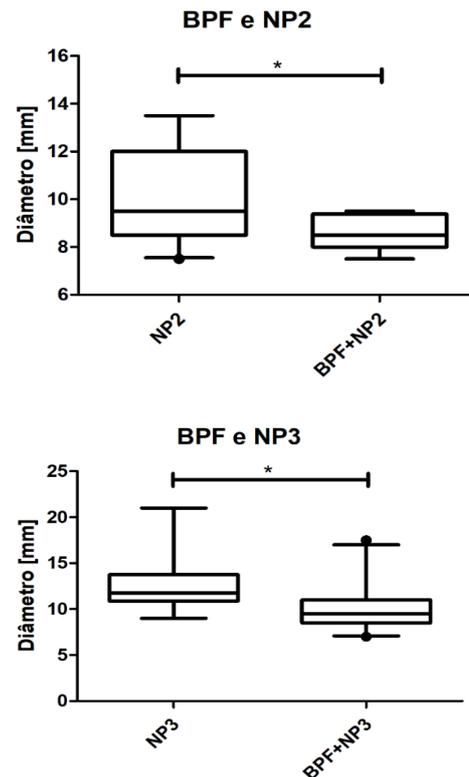
Observou-se diferença estatística em todos os antibióticos (* $p < 0,05$) (ciprofloxacino 5 μg $n = 12$, amoxicilina 10 μg $n = 13$ e oxacilina 1 μg $n = 9$)



A figura 15 mostra o efeito da associação do BPF com NP1, NP2 e NP3. O BPF inibiu em 18,2 % o efeito antimicrobiano do NP quando comparado com o grupo de NP.

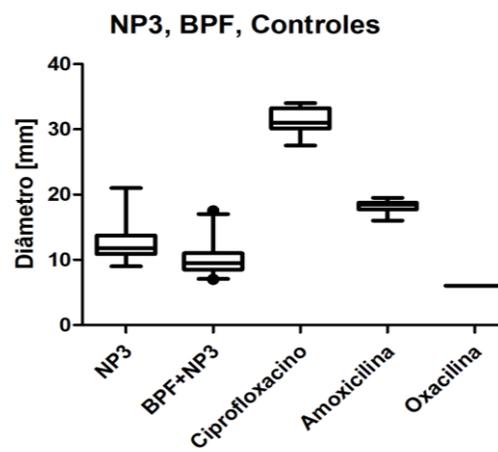
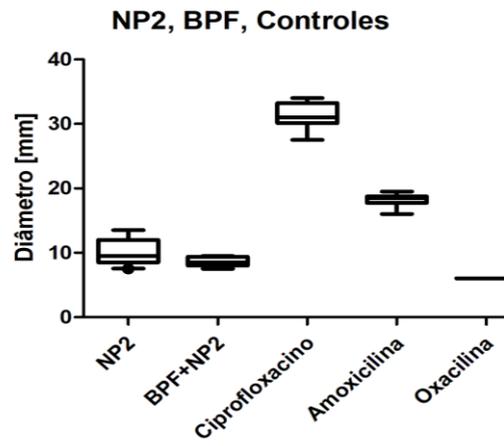
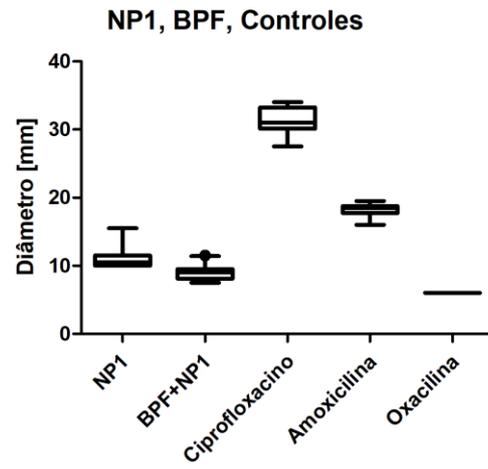
Figura 15 - Efeito inibitório dos BPFs sobre o NPs: quando adicionado o BPF aos NPs, observou-se redução do efeito antimicrobiano em todas as concentrações de NP. Houve diferença estatística para todas as concentrações de NP e BPF+NP (* $p < 0,05$) (NP1 - 1mg/mL $n = 11$; NP2 - 2,5mg/mL $n = 10$; NP3 - 5mg/mL $n = 10$; BPF1 - 1mg/mL $n = 10$; BPF2 - 2,5mg/mL $n = 12$; BPF3 - 5mg/mL $n = 13$)





Quando comparamos zona de inibição dos NPs sozinhos ou adicionado ao BPF com a zona de inibição promovida pelos antibióticos verificamos que os NPs e BPFs+NPs promoveram pouco efeito inibitório (Figura 16).

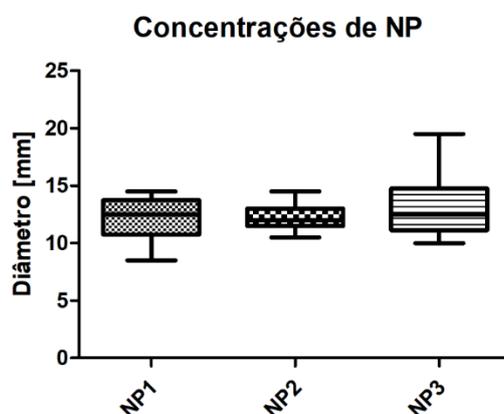
Figura 16 - Comparação dos halos de inibição dos NPs com BPFs+NPs e controles: observa-se pouca inibição das concentrações de NPs frente aos antibióticos. Houve diferença estatística entre os NPs/BPFs+NPs e os antibióticos. (* $p < 0,05$). (ciprofloxacino 5 μg $n = 12$, amoxicilina 10 μg $n = 13$ e oxacilina 1 μg $n = 9$; NP1 - 1mg/mL $n = 11$, NP2 - 2,5mg/mL $n = 10$ e NP3 - 5mg/mL $n = 10$; BPF1 - 1mg/mL $n = 10$, BPF2 - 2,5mg/mL $n = 12$ e BPF3 - 5mg/mL $n = 13$)



Análise da associação de BPF com NP frente a *S. aureus*

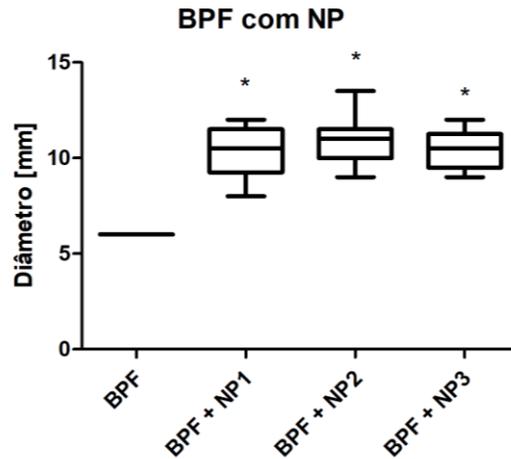
Foram realizados os mesmos testes utilizando a bactéria *S. aureus* frente ao BPF e NP. A Figura 17 mostra as concentrações de NP e seus efeitos inibitórios no crescimento da *S. aureus*. Não houve diferença no diâmetro dos halos de inibição nas concentrações testadas.

Figura 17 - Diâmetro dos halos de inibição nas diversas concentrações de NP: não foi observada diferença estatística entre as doses utilizadas. (NP1 - 1mg/mL n= 13; NP2 - 2,5mg/mL n= 11; NP3 - 5mg/mL n= 10)



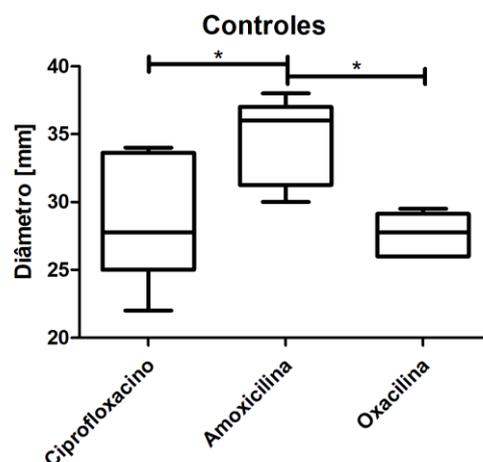
Quando foi testado o BPF sozinho, não foi observada a formação do halo de inibição, não tendo efeito antimicrobiano frente *S. aureus* (Figura 18).

Figura 18 - Diâmetro dos halos de inibição nas diversas concentrações de NP com BPF: observa-se que somente o BPF (n= 9) não teve efeito antibacteriano sobre a *S. aureus*, sendo estatisticamente diferente de BPF+NP1, BPF+NP2 e BPF+NP3 (* $p < 0,05$ comparado com BPF) (BPF+NP1 - 1mg/mL n= 9; BPF+NP2 - 2,5mg/mL n= 11; BPF+NP3 - 5mg/mL n= 9)



Os antibióticos ciprofloxacino, amoxicilina e oxacilina também foram testados para cepa de *S. aureus*, observou-se inibição em diferentes graus, onde a amoxicilina foi mais eficaz em inibir o crescimento bacteriano (Figura 19).

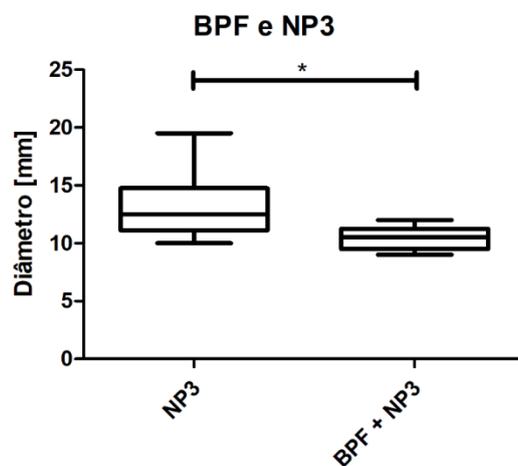
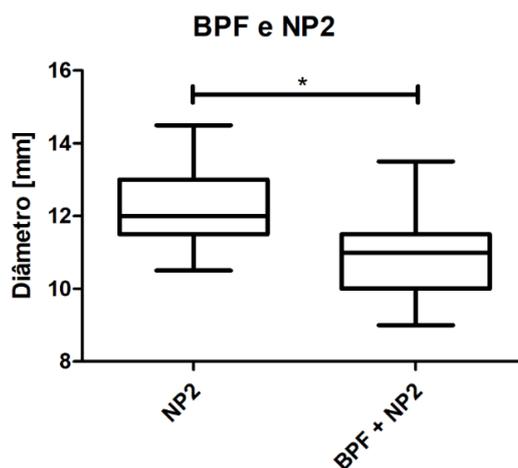
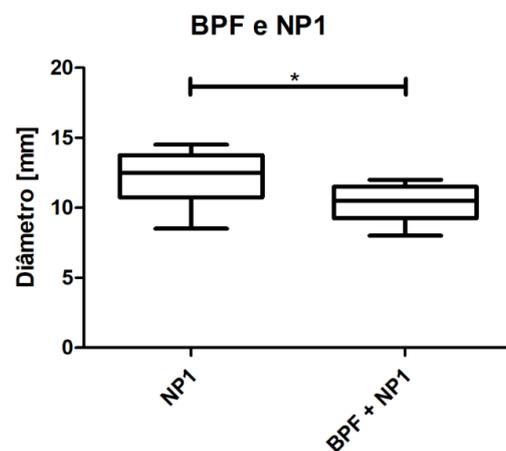
Figura 19 - Efeitos dos antibióticos sobre *S. aureus*: os antibióticos testados ciprofloxacino, amoxicilina e oxacilina inibiram o crescimento de *S. aureus*. Observou-se diferença estatística em todos os antibióticos (* $p < 0,05$) (ciprofloxacino 5 μg $n = 8$, amoxicilina 10 μg $n = 9$ e oxacilina 1 μg $n = 6$)



A figura 20 mostra o efeito da adição de BPF com NP1, NP2 e NP3. O BPF inibiu em 13,5% o efeito antimicrobiano do NP quando comparado com o grupo tratado com NP.

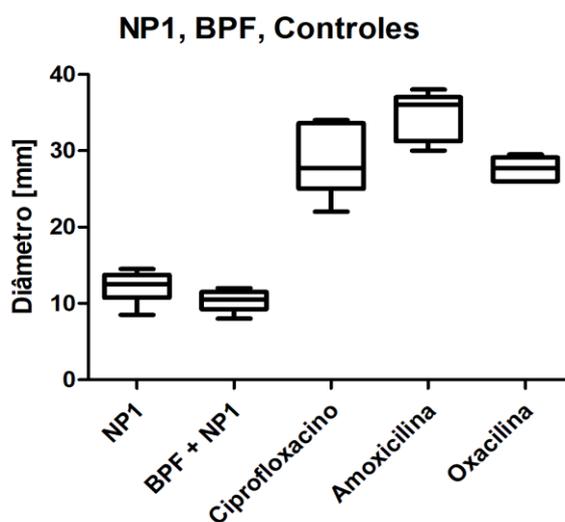
Figura 20 - Efeito inibitório dos BPFs sobre os NPs: quando adicionado o BPF aos NPs, observou-se redução da atividade antimicrobiana em todas as

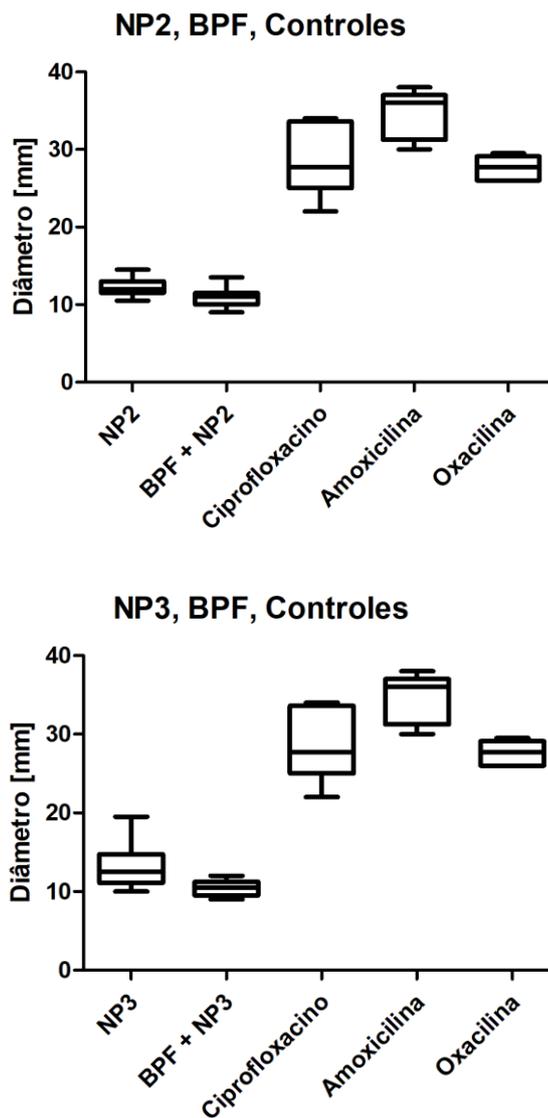
concentrações de NP. Houve diferença estatística para todas as doses de NP (* $p < 0,05$) (NP1 - 1mg/mL $n = 13$; NP2 - 2,5mg/mL $n = 11$; NP3 - 5mg/mL $n = 10$; BPF+NP1 - 1mg/mL $n = 9$; BPF+NP2 - 2,5mg/mL $n = 11$; BPF+NP3 - 5mg/mL $n = 9$)



Quando comparamos o diâmetro dos halos de inibição promovido pelo NPs, BPF+NPs e controles (antibióticos) frente ao *S. aureus*, verificamos resultados semelhantes aos encontrados para *E. coli*, ou seja, os antibióticos foram mais eficazes em inibir o crescimento das bactérias. Os 3 antibióticos utilizados foram eficazes em inibir a *S. aureus* (Figura 21).

Figura 21 - Comparação dos halos de inibição dos NPs com BPF+NPs e controles frente ao *S. aureus*: observa-se pouca inibição das concentrações de NPs frente aos antibióticos. Houve diferença estatística entre os NPs/BPFs+NPs e os antibióticos. (* $p < 0,05$). (ciprofloxacino 5 μg $n = 8$, amoxicilina 10 μg $n = 9$ e oxacilina 1 μg $n = 6$; NP1 - 1mg/mL $n = 13$, NP2 - 2,5mg/mL $n = 11$ e NP3 - 5mg/mL $n = 10$; BPF+NP1 - 1mg/mL $n = 9$, BPF+NP2 - 2,5mg/mL $n = 11$ e BPF+NP3 - 5mg/mL $n = 9$)





Ensaio antimicrobiano em disco de difusão em ágar

Os resultados encontrados nos testes do controle positivo (antibióticos) (Tabela 06) ficaram dentro dos limites aceitáveis dos halos de inibição utilizados no controle de qualidade com cepas de referência, segundo tabela do manual de interpretação das zonas de inibição, CLSI - edição 2019.

Tabela 06 – Limites aceitáveis dos halos de inibição dos antimicrobianos utilizados no controle de qualidade para monitorar a acurácia dos testes de disco de difusão em organismos não fastidiosos – Técnica de difusão em ágar Mueller-Hinton

Antimicrobiano	Concentração do Disco	<i>Escherichia coli</i> ATCC - 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC- 25923
Amoxicilina (Ampicilina)	10	15-22	27-35
Ciprofloxacina	5	29-37	22-30
Oxacilina	1	-	18-24

Fonte: <http://www.dme.ind.br/wp-content/uploads/EDI%C3%87%C3%83O-CLSI-2019.pdf>

Acesso em: 01 fev.2021.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A CIM foi determinada como a menor concentração de BPF+NP e do NP que inibiu o crescimento das bactérias testadas e a CBM que inibiu completamente o crescimento microbiano.

Através da análise e interpretação da Tabela 07 os resultados de CBM frente aos microrganismos testados quando relacionados às CIM permitem definir o modelo de ação dos íons de prata associados ou não com o BPF sobre as células bacterianas como bacteriostática ou bactericida. Na comparação dos microrganismos observa-se uma maior tolerância das bactérias gram-positiva tanto para BPF+NP quanto para no NP, apresentando maior efeito antimicrobiano sobre as bactérias gram-negativas. O NP foi mais efetivo do que o BPF+NP para ambos os microrganismos. Avaliando os valores do CIM das substâncias testadas, podemos constatar que a interação do BPF com NP reduz a ação antimicrobiana do NP, visto que o CIM para substância isolada foi menor do que da associação com BPF.

Tabela 07 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de BPF+NP e NP sobre bactérias gram-positiva e gram-negativa

Microorganismo	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		CBM ($\mu\text{g/mL}$)	
	BPF+NP	AgNO ₃ (NP)	BPF+NP	AgNO ₃ (NP)
E. coli	7,81	3,9	15,62	7,81
S. aureus	250	7,81	1000	15,62

A concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração de BPF+NP e NP que inibiu o crescimento microbiano e concentração bactericida mínima que inibiu completamente o crescimento microbiano após 20h de incubação a 37° C.

Fonte: Autoria própria.

6 DISCUSSÃO

O método de difusão em ágar foi utilizado para detectar concentrações com maior atividade antimicrobiana. Sendo a eficácia do antimicrobiano diretamente proporcional ao tamanho do halo de inibição formado e medido em milímetros. (BAUER et al., 1966) No presente estudo foram utilizadas bactérias gram-positivas e gram-negativas representadas pelas *Staphylococcus aureus* e *Echerichia coli*.

Atualmente não há padronização para determinar a eficácia do nitrato de prata *in vitro*. Os estudos utilizam métodos de difusão em ágar e determinação de CIM e CBM de acordo com o documento vigente recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute*, mas não existe uma norma reguladora para os resultados *in vitro* e tampouco entre resistência e sensibilidade *in vivo*, como acontece com agentes antimicrobianos e antifúngicos convencionais. (TROTT et al., 2007).

Apesar dos halos encontrados nos tratamentos com BPF+NP e NP tenham sido menores do que os halo dos testes do controle positivo (antibióticos) eles são similares com os resultados na literatura. MEDEIROS (2019) estudando as propriedades antimicrobianas de nanopartículas de prata de 35 a 50 nm e 60 a 80 nm encontrou halos médio 19 e 17 mm para *P. aeruginosa* e 18 e 13 mm para *S. aureus* respectivamente e filme de nanocelulose de 6 a 8,5 mm para *S. aureus* e de 6 a 8,75 mm pra *P. aeruginosa*. Enquanto KONG e JANG (2008) verificando as propriedades antibacterianas da nanofibra de poli (metacrilato de metila) contendo nanopartículas de prata e sulfadiazina de prata frente a *E. coli*, após 24h de incubação mensurou halos de 45mm e 16mm respectivamente (onde o tamanho dos pellets inseridos nas placas contendo os compostos de

prata foi de 13mm). CAVASSIN (2013) num teste *in vitro* de nanopartículas de prata: NanoAg citrato, PVA e quitosana frente a *S aureus* e *P. aeruginosa* obteve halos entre 10 e 20 mm. Considerando o halo de inibição da proliferação dos microrganismos testados estes resultados permitem verificar que BPF+NP e NP demonstram capacidade de inibir as bactérias.

A capacidade de difusão de cada antimicrobiano pode influenciar no tamanho da zona de inibição. A metodologia recomendada pelo CLSI foi desenvolvida para análise de antimicrobianos usados em terapias convencionais, que geralmente contêm substâncias de natureza hidrofílica, e difundem-se mais facilmente em ágar, enquanto substâncias viscosas, insolúveis em água, voláteis ou como os óleos essenciais que possuem uma composição química complexa, podem não ter uma boa difusão em ágar (MONTANARI et al., 2012).

Observou-se uma diferença nos halos de inibição BPF+NP em relação aos halos do tratamento com NP, com uma redução do efeito antimicrobiano em 18,2% frente a *E. coli* e 13,5% para *S. aureus*. Que pode ter ocorrido devido a consistência gelatinosa do BPF dificultando a difusão no ágar e influenciando no tamanho do halo de inibição, ou pela constituição do diluente que compõe BPF com base em cloreto precipitando os íons de prata e interferido na ação bactericida. Contudo, vários outros fatores também podem contribuir para esse efeito, como complexação com diferentes proteínas no meio e diferentes precipitações de sais pouco solúveis como AgCl (KITTLER et al., 2010; MONOPOLI et al., 2011).

CERESA et al. (2019) encontrou em colágeno enriquecido com íons de prata e não para o alginato também associado a íons de prata uma atividade antibacteriana não dependente da dose, que pode ter ocorrido devido à maior retenção dos íons de prata na estrutura do colágeno, tem uma consistência gelatinosa. Este fato também pode ter influenciado na atividade antibacteriana do NP quando associado ao BPF.

Segundo LANSDOWN (2010) os íons de prata liberados reagem na presença de cloreto, formando um precipitado de cloreto de prata que não tem ação antimicrobiana e RICKETTS (1970) demonstrou através de um eletrodo específico de íon, que mede a concentração de íons de prata nas soluções, visando quantificar os íons de prata em curativos para queimaduras, quando

entram em contato com exsudato da ferida precipitam em AgCl reduzindo os íons de prata a um nível muito baixo. O efeito antibacteriano depende da disponibilidade de íons de prata da solução em contato com o precipitado.

Alguns estudos demonstraram que microrganismos gram positivos são mais tolerantes a Ag⁺ (RHIM et al., 2006; KIM et al., 2007; EGGER, et al., 2009). O que corrobora com os resultados encontrados para os tratamentos com NP onde houve uma diferença significativa da concentração NP3 em relação a NP2 frente a *E. coli* e para *S. aureus* não constatou diferença nas concentrações testadas, ou seja, mesmo aumentando as concentrações não houve diferença significativa nos tamanhos dos halos de inibição.

De acordo com alguns autores a menor eficiência do NP frente as bactérias gram-positivas podem ocorrer devido as peculiaridades da parede celular. (FENG et al., 2000; KIM et al., 2007; SHRIVASTAVA et al., 2007). Bactérias gram-negativas o peptídeoglicano constitui uma fração menor do total da parede celular e apresentam uma membrana externa, composta de proteínas porinas, lipopolissacarídeos e fosfolipídios, enquanto as bactérias gram-positivas possuem uma camada espessa de peptídeoglicano e ácido teicoico e lipoteicoicos com carga fortemente negativa, podendo haver sequestro de íons livres de Ag⁺. Desta forma, gram-positivos liberariam menos íons Ag⁺ para atingirem a membrana citoplasmática e demais alvos no espaço intracelular, podendo ser menos suscetível (MORONES et al., 2005; PELCZAR et al., 2007; EGGER et al., 2009).

Foram realizados os testes de CIM concentração inibitória mínima visando estabelecer a menor concentração de BPF+NP e NP capaz de inibir os microrganismos testes, e de CBM concentração bactericida mínima determinando a menor concentração capaz de impedir o total crescimento dos microrganismos testes.

Para *E. coli* e *S. aureus* a CIM encontrada com o tratamento BPF+NP foram 7,81 e 250 µg/mL e para o NP 3,9 e 7,81 µg/mL. Enquanto CBM encontrada para BPF+NP foram de 15,62 e 1000 µg/mL e com o tratamento com NP de 7,81 e 15,62 µg/mL respectivamente. EGGER et al. (2009) se refere a estudos anteriores que revelaram CIMs de partículas de prata pra *Escherichia coli* variando de 2 a 75 µg/mL (MORONES et al. 2005, SAKAR et al., 2007). E encontrou no tratamento com AgNO₃, CIM para *E. coli* e *S. aureus* de 7,8 e 15,6

$\mu\text{g/mL}$ respectivamente e CBM de 15,6 $\mu\text{g/mL}$ para ambos os microrganismos, e para o tratamento com nanocomposito (sílica) de prata CIM de 62,5 e 250 $\mu\text{g/mL}$ e CBM de 125 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, estes resultados apontam na mesma direção dos resultados encontrados neste estudo.

Comparação entre método disco-difusão e microdiluição

Nas amostras estudadas foi possível verificar correlação entre os resultados obtido em milímetros quando comparados aos obtidos por microdiluição. Os resultados dos halos de inibição formado com o tratamento BPF+NP e os MIC e CBM encontrados para a mesma formulação, observa-se uma redução da ação do NP, o BPF+NP e o NP foram mais efetivos para as bactérias gram-negativa do que para as bactérias gram-positiva evidenciados nos tamanhos de halos de inibição e na microdiluição e o NP apresentou melhor ação bactericida do que o BPF+NP paras as bactérias testadas.

7 CONCLUSÕES

1. O BPF+NP e o NP apresentaram efeito antibacteriano sobre a *E. coli* e *S. aureus*.
2. Demonstrou maior eficácia para *E. coli* (gram negativa) quando comparado com *S. aureus* (gram positiva).
3. O BPF quando isolado não tem um efeito antibacteriano.
4. O BPF quando associado ao NP produz ação antibacteriana, mas esse efeito é menor do que o promovido pelo NP isolado em 18,2% para *E. coli* e 13,5% para *S. aureus*.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, J. W. History of the Medical Use of Silver. **Surgical Infections**, 10(3), 289–292. 2009. doi:10.1089/sur.2008.9941 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19566416/> Acesso em: 17 jan. 2021.
- ALVING, B. M.; WEINSTEIN, M. J.; FINLAYNSON, J. S.; MENITONE, J. E.; FRATANTONI, J. C. Fibrin sealant: summary of a conference on characteristics and clinical uses. **Transfusion**, 35:783-790, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7570942/> Acesso em: 17 jan. 2021.
- ATIYEH BS, COSTAGLIOLA M, HAYEK SN, DIBO SA. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns*. Mar;33(2):139-48. 2007 doi: 10.1016/j.burns.2006.06.010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0305417906001926?via%3Dihub> Acesso em: 26 jan. 2021.
- BALAZS, D. J.; TRIANDAFILLU, K.; WOOD, P.; CHEVOLOT, Y.; VAN DELBEN, C.; HARMS, H. Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments. **Biomaterials**, v. 25, p. 2139-2151, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14741629/> Acesso em: 17 jan. 2021.
- BARBOSA, M. D. S.; GREGH, S. L. A.; PASSANEZI, E. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. **J Periodontol**. 78(10): 2026-31, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18062124/> Acesso em: 17 jan. 2021.
- BARROS, L. C.; FERREIRA, Jr. R. S.; BARRAVIERA, S. R. C. S.; STOLF, H. O.; THOMAZINI, I. A. S.; MENDES M. J. S. G. et al. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: Applications in medicine. **J Toxicol Environ Health, Part B**. 12(8): 553-571, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20183534/> Acesso em: 17 jan. 2021.
- BARROS, L. C.; SOARES, A. M.; COSTA, F.L.; RODRIGUES, V. M.; FULY, A. L.; GIGLIO JR. et al. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis**.17(1):23-33, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S167891992011000100004 Acesso em: 17 jan. 2021.
- BARROS, C.N.; YAMADA, A. L. M.; FERREIRA, Jr. R. S.; BARRAVIERA, B.; HUSSNI, C. A.; SOUZA, J. B.; WATANABE, M. J.; RODRIGUES, C. A.; ALVES, A. L. A new heterologous fibrin sealant as a scaffold to cartilage repair—experimental study and preliminary results. **Exp Biol Med (Maywood)**. 241(13): 1410–5. 2011. doi: 10.1177/15353702115597192. Epub 2015 Aug 10. PMID: 26264444; PMCID: PMC4994917. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26264444/> Acesso em: 17 jan. 2021.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W. M. M; SCHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American*

Journal of Clinical Pathology. 36, 3. 1966. Disponível em: <https://asm.org/ASM/media/docs/105bauer.pdf> Acesso em: 26 jan.2021.

BOWLER, P.G., JONES, S.A., WALKER, M., PARSONS, D. Microbicidal properties of a silver containing Hydrofiber¹ dressing against a variety of burn wound pathogens. **J. Burn Care Rehabil.** 25, 192–196, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15091147/> Acesso em: 26 jan. 2021.

BRENNAN, M. Fibrin glue. **Blood Rev.** Dec; 5(4): 240-4. 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1782483/> Acesso em: 17 jan. 2021.

BUCHAIM, D. V.; RODRIGUES, A. C.; BUCHAIM, R. L.; BARRAVIERA, B.; FERREIRA JR, R. S.; ROSA JR, G. M.; BUENO, C.R.S. et al. The new heterologous fibrin sealant in combination with low-level laser therapy (LLLT) in the repair of the buccal branch of the facial nerve. **Lasers Med Sci.** 2016; 31(5): 965-72. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/172873> Acesso em: 17 jan. 2021.

BUCKLEY, M. J.; BECKMAN, E. J. Adesive use in oral and maxilla ofacial surgery. **Oral Maxillofac, Surg. Clin.** 22 (1): 195-9, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20159487/> Acesso em: 17 jan. 2021.

CASSARO, C.; JUSTULIN JR, L. A.; LIMA, P. R.; GOLIM, M.; BISCOLA, N.; CASTRO, M.; OLIVEIRA, A.; DOICHE, D.; PEREIRA, E.; FERREIRA JR, R. S.; BARRAVIERA, B. Fibrin biopolymer as scaffold candidate to treat bone defects in rats. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.** 25 (1) 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/336992074_Fibrin_biopolymer_as_scaffold_candidate_to_treat_bone_defects_in_rats Acesso em: 07 fev. 2021.

CAVASSIN, E. D. **Estudo da ação in vitro de nanopartícula de prata.** 2013. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. doi:10.11606/T.5.2013.tde-26022014-124328. Disponível em: Acesso em: 15 fev. 2021.

CERESA C, FRACCHIA L, MARCHETTI A, RINALDI M, BOSETTI M. Injectable Scaffolds Enriched with Silver to Inhibit Bacterial Invasion in Tissue Regeneration. **Materials (Basel).** 12(12):1931,2019. doi:10.3390/ma12121931. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6631215/> Acesso em 26 jan. 2021.

CHARURI, C. Como vai a sua mente. Pag 56 Edição digital com textos da 6ª. reimpressão (março de 2019) Disponível em: [Como_Vai_a_Sua_Mente_Dr_Celso_Charuri_BRA_Digital_Fev_2020.pdf](https://www.provida.net/Como_Vai_a_Sua_Mente_Dr_Celso_Charuri_BRA_Digital_Fev_2020.pdf) (provida.net) Acesso em: 12 fev. 2021.

CHERNOUSOVA, S.; EPPLÉ, M. Silver as Antibacterial Agent: ion, nanoparticle, and Metal **Angew. Chem., Int. Ed.**, 52, 1636, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23255416/> Acesso em: 17 jan. 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Normas de Padronização dos Testes de Sensibilidade Disco-Difusão para Antimicrobianos por disco-difusão – Documento M2-A8 – Oitava Edição, 2003. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_opasm2-a8.pdf Acesso em: 08 fev. 2021

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Antibiograma interpretação das zonas de inibição e concentração inibitória mínima. Ed 2019. Disponível em: <http://www.dme.ind.br/wp-content/uploads/EDI%C3%87%C3%83O-CLSI-2019.pdf> Acesso em: 01 fev.2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. document M07-A9. Wayne, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=564ceedf5e9d97daf08b45a2&assetKey=AS%3A297254750572544%401447882463055>. Acesso em: 26 jan. 2021.

CLEMENT, J. L.; JARRETT, P. S. Antibacterial silver. **Met Based Drugs**. 1(5-6): 467–482,1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18476264/> Acesso em: 17 jan. 2021.

CRÉDÉ, C. S. F. Die verhütung der augenentzündung der neugeborenen. Arch. f. Gynaekologie, Berlin, 17:50-3, 188. Disponível em: <https://wellcomecollection.org/works/zwuf5amb> Acesso em: 03 mai. 2020.

CUNHA, M.; MENEZES, F.; SANTOS, G.; PINTO, C.; BARRAVIERA, B.; MARTINS, V.; PLEPIS, A.; FERREIRA JR, R. S. Hydroxyapatite and a New Fibrin Sealant Derived from Snake Venom as Scaffold to Treatment of Cranial Defects in Rats. **Materials Research**. 18. 196-203. 10.1590/1516-1439.316014, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/276900108_Hydroxyapatite_and_a_New_Fibrin_Sealant_Derived_from_Snake_Venom_as_Scaffold_to_Treatment_of_Cranial_Defects_in_Rats Acesso em: 26. jan. 2021.

DUNN, K.; JONES, V. E. The role of Acticoat™ with nanocrystalline silver in the management of burns. **Burns** 30 Suppl. 1 SILS9, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15327800/> Acesso em: 17 jan. 2021.

EGGER, S.; LEHMANN, R.P.; HEIGHT, M.J.; LOESSNER, M.J.; SCHUPPLER, M. Antimicrobial properties of a novel silver-silica nanocomposite material. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2973-2976, 2009. doi: 10.1128/AEM.01658-08. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2681698/> Acesso em: 07 fev. 2021.

EL-CHAHABY, G. A.; AHMAD, A. F. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Pistacia lentiscus* Leaves extract and investigation of their antimicrobial effect. **Orient J Chem**, 27(3) 929-936, 2011. Disponível em:

<http://www.orientjchem.org/vol27no3/biosynthesis-of-silver-nanoparticles-using-pistacia-lentiscus-leaves-extract-and-investigation-of-their-antimicrobial-effect/>
Acesso em: 17 jan. 2021.

FATTAHI, T.; MOHAN, M. Clinical Applications of Fibrin Sealants. **J Oral Maxillofac Surg** 62: 218-224, 2004. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14762755/> Acesso em: 17 jan. 2021.

FENG Q. L.; WU J; CHEN G. Q.; CUI F. Z.; KIM T. N.; KIM J. O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **J Biomed Mater Res**. Dec 15;52(4):662-8. doi: 10.1002/1097-4636(20001215)52. 2000 Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11033548/> Acesso em: 26 jan. 2021.

FERNANDES, P. A. **Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata**. 2014. 87 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimento). Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais. 2014. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/510/1/texto%20completo.pdf>. Acesso em 26 jan. 2021.

FERREIRA Jr, R. S.; BARROS, L. C.; ABBADE, L. P. F.; BARRAVIERA, S. R. C. S.; SILVARES, M. R. C.; PONTES, L. G.; SANTOS, I.; BARRAVIERA, B. Heterologous fibrin sealant derived from snake venom: from bench to bedside – an overview. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. 23: 21, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jvatitd/v23/1678-9199-jvatitd-s40409-017-0109-8.pdf> Acesso em: 17 jan. 2021.

FERRARO, G. C.; MORAES, J. R. E.; PEREIRA, G. T.; MORAES, F. R.; CAMARGO, M. H. B. Clinical and morphological evaluation of snake venom derived fibrin glue on the tendon healing in dogs. **J Anim Toxins incl Trop Dis**. 11(4): 433-46, 2005. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992005000400005 Acesso em: 17 jan. 2021.

FREIRE, NAIANA B.; PIRES, LARISSA C.S.R.; OLIVEIRA, HELINANDO P. AND COSTA, MATEUS M.. Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata sobre isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de organismos aquáticos. **Pesq. Vet. Bras. [online]**, vol.38, n.2, pp.244-249. ISSN 1678-5150. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-4805>. 2018 Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2018000200244&script=sci_abstract&tlng=pt Acesso em: 26 jan. 2021.

FRIERIA, M.; KUMARB, K.; BOUTI, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health** 10, 369—378, 2017. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27616769/>. Acesso em: 17 jan. 2021.

FOX, C. L. Silver sulfadiazine – a new topical therapy for *Pseudomonas* in burs. **Arch Surg**. 96: 184-88, 1968. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5638080/>. Acesso em: 17 jan. 2021.

GATTI M. A. N.; VIEIRA L. M.; BARRAVIEIRA B.; BARRAVIERA S. R. C. S. Treatment of venous ulcers with fibrin sealant derived from snake venom. **J Anim Toxins incl Trop Dis**. 17(2): 226-9, 2011. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992011000200015. Acesso em: 17 jan. 2021.

GLISIC, B. D.; SENEROVIC, L.; COMBA, P.; WADEPOHL, H.; VESELINOVIC, A.; MILIVOJEVIC, D. R.; DJURAN, M. I.; NIKODINOVIC, J. Silver(I) complexes with phthalazine and quinazoline as effective agents against pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains **J. Inorg. Biochem** 155, 115, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26687023/>. Acesso em: 17 jan. 2021.

GRECO, F.; DEPALMA, L.; SPAGNOLO, N.; ROSSI, R.; SPECCHIA, N.; GIGANTE, A. Fibrin-antibiotic mixtures: an *in vitro* study assessing the possibility of using a biological carrier for local drug delivery. **J. Biomed. Mat. Res.** 25, 39-51, 1991. Disponível em: Acesso em: 17 jan. 2021.

GREULICH, C.; BRAUN, D.; PEETSCH, A.; DIENDORF, J.; SIEBERS, B.; EPPLE, M.; KÖLLER, M. The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range. **RSC Adv.** 2, 6981-6987, 2012. DOI: 10.1039/C2RA20684F Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2012/ra/c2ra20684f> Acesso em: 26 jan. 2021.

GUÉHENNEC, L.; LAYROLLE, P.; DACULSI, G. A review of bioceramics and fibrin sealant. **European Cells and Materials**. 8:1-11, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15494929/>. Acesso em: 17 jan. 2021.

HADRUP N, SHARMA AK, LOESCHNER K. Toxicity of silver ions, metallic silver, and silver nanoparticle materials after *in vivo* dermal and mucosal surface exposure: A review. **Regul Toxicol Pharmacol**. Oct; 98:257-267. 2018. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.08.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30125612/> Acesso em: 26 jan. 2021.

HALSTED, W. S.; Introduced silver foil as dressing for closed wounds. Biographical memoir. **National Academy of Sciences**. p. 163 Disponível em: <http://nasonline.org/publications/biographical-memoirs/memoir-pdfs/halsted-w-s.pdf> Acesso em: 07 fev. 2021.

HERMANS, M.H. Silver-containing dressings and the need for evidence. *Am. J. Nursing* 106, 60–68. **Hurlow, J., Bowler, P.G.**, 20, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17133010/>. Acesso em 26 jan. 2021.

HIDALGO E, DOMÍNGUEZ C. Study of cytotoxicity mechanisms of silver nitrate in human dermal fibroblasts. **Toxicol Lett**. Sep 15;98(3):169-79. doi: 10.1016/s0378-4274(98)00114-3. PMID: 9788585. 1998 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9788585/> Acesso em: 01 fev. 2021.

HINO, M.; ISHIKO, O.; HONDA, K. I.; YAMANE, T.; OHTA, K.; TAKUBO, T.; TATSUMI, N. Transmission of symptomatic parvovirus B19 infection by fibrin

sealant used during surgery. **Br. J. Haematol.** 108: 194-195, 2000. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2141.2000.01818.x>. Acesso em: 17 jan. 2021.

HOLCOMB, J. B.; PULSATERI A.E.; HESS Jr, et al. Implications of new dry fibrine sealant technology of trauma surgery [review]. **Surg Clin North Am.** 77: 943-52, 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/Science/article/abs/pii/S003961090570596X>. Acesso em: 17 jan. 2021.

HOLT, K. B.; BARD, A. J. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag. **Biochem.** 44, 13214–13223, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16185089/> Acesso em: 17 jan. 2021.

KALIMUTHU K, SURESH BABU R, VENKATARAMAN D, BILAL M, GURUNATHAN S. Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. **Colloids Surf B Biointerfaces.** Aug 1;65(1):150-3, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927776508000945> 26 Acesso em: 26 jan. 2021.

KARLSMARK, T; AGERSLEV, R. H.; BENDZ, S. H.; LARSEN, J. R.; ROED-PETERSEN J.; ANDERSEN, K. E. Clinical performance of a new silver dressing, Contreet Foam, for chronic exuding venous leg ulcers. **Journal of Wound Care**, vol. 12, no. 9, pp. 351–354, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14601228/> Acesso em: 29 jan. 2021

KIM, J.S.; KUK, E.; YU, K.N.; KIM, J.H.; PARK, S.J.; LEE, H.J.; KIM, S.H.; PARK, Y.K.; PARK, Y.H.; HWANG, C.Y.; KIM, Y.K.; LEE, Y.S.; JEONG, D.H.; CHO, M.H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, p. 95-101, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1549963406003467?via%3Dihub> Acesso: 26 jan. 2021.

KITTLER, S.; GREULICH, C.; GEBAUER, J. S.; DIENDORF, J.; TREUEL, L.; RUIZ, L.; GONZALEZ-CALBET, J. M.; VALLET-REGI, M.; ZELLNER, R.; KOELLER, M.; EPPLE, M. The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles. **J. MATER. CHEM.**, 20, 512–518, 2010. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2010/jm/b914875b#!divAbstract> Acesso em: 07 fev. 2021.

KONG H, JANG J; Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. **Langmuir.** 24:2051-6, 2008. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la703085e> Acesso em: 21 jan. 2021.

LANSDOWN, A. B. G. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. **Advances in Pharmacological Sciences**, 2010 Disponível em: <https://downloads.hindawi.com/journals/aps/2010/910686.pdf> Acesso em: 26 jan. 2021.

LEITE, C. V. S.; NARESSE, L. E.; ARANTES, H. L.; LOPES, A. F.; THOMAZINI-SANTOS, I. A.; GIANNINI, M. J. S. M.; MERCADANTE, M. C.; BARRAVIEIRA, B.; KOBAYASI, S. An evaluation by rat colon anastomosis of the efficacy of fibrin glue derived from snake venom. **J Venom Anim Toxins**. 6: 180-93, 2000. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-79302000000200004&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 17 jan. 2021.

LEITE A. P. S.; PINTO C. G.; TIBÚRCIO F. C.; SARTORI A. A.; CASTRO R. A.; BARRAVIERA B.; FERREIRA R. S. JUNIOR; FILADELPHO A. L.; MATHEUS S. M. M. Heterologous fibrin sealant potentiates axonal regeneration after peripheral nerve injury with reduction in the number of suture points. **Injury**. Apr;50(4):834-847. doi: 10.1016/j.injury.2019.03.027. 2019 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30922661/> Acesso em: 02 fev. 2021.

LIU, J.; SONSHINE, D. A.; SHERVANI, S.; HURT, R. H. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. **ACS Nano**. 4:6903-6913, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20968290/>. Acesso em: 17 jan. 2021.

MARTINOWITZ, U.; SPOTNITZ, D. Fibrin tissue adhesives. **Thromb Haemost**, 78 (1): 661-666, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9198235/> Acesso em: 17 jan. 2021.

MASCHARAK, P. K.; PINTO, M. M; CHAKRABORTY, I.; SIMONTON, W. S.; ANDRADE, M. R.; BRASLAU, R. Tracking silver delivery to bacteria using turn-on fluorescence. **This journal is The Royal Society of Chemistry**. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27928567/>. Acesso em: 17 jan. 2021.

MATRAS, H. Fibrin seal: The state of the art. *J Oral Maxillofacial Surgery* Vol. 43, Ed 8, 605-611, 1985. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3891930/> Acesso em: 17 jan. 2021.

MATSUMURA, Y., YOSHIKATA, K., KUNISAKI, S., & TSUCHIDO, T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. **Applied and environmental microbiology**, 69(7), 4278–4281. <https://doi.org/10.1128/aem.69.7.4278-4281.2003> Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC165194/> Acesso em: 26 jan. 2021.

MEDEIROS, C. H. S. **Estudo das propriedades antimicrobianas de filmes de nanocelulose e nanopartículas de prata**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/11442/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Cassiano%20Medeiros%20-%20UFSCar%20-%2002.05.19.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 17 jan. 2021.

- MEHDIZADEH, M.; YANG, J. Design strategies and applications of tissue adhesives. **Macromol. Biosci.** 13, 271–288, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23225776/>. Acesso em: 17 jan. 2021.
- MILANOWSKI, M.; MONEDEIRO, F.; ZŁOCH, M.; RATIU, I. A.; POMASTOWSKI, P.; LIGOR, T.; MARTINIS, B.S.; BUSZEWSKI, B. Profiling of VOCs released from different salivary bacteria treated with non-lethal concentrations of silver nitrate, **Analytical Biochemistry**, 578, (36-44), 2019 <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.05.007>. Disponível em: <https://www.science-direct.com/science/article/pii/S0003269719302787> Acesso em: 26 jan. 2021.
- MIRAFTAB, M., MASOOD, R., EDWARD-JONES, V. A new carbohydrate-based wound dressing fibre with superior absorption and antimicrobial potency. **Carbohydr. Polym.** 101, 1184–1190, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861713010795>. Acesso em: 26 jan. 2021.
- MONOPOLI, M. P.; WALCZYK, D.; CAMPBELL, A.; ELIA, G.; LYNCH, I.; BOMBELLI, F. B.; DAWSON, K. A. Physical–chemical aspects of protein corona: relevance to *in vitro* and *in vivo* biological impacts of nanoparticles. **J. AM. CHEM. SOC.** 133, 2525–2534, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21288025/>. Acesso em: 26 jan. 2021.
- MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMÍREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**. 16(10):2346-53, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20818017/> Acesso em: 26 jan. 2021.
- MONTANARI, R. M.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, C. J.; ANDRADE, N. J.; ISMAIL, F. M. D.; BARBOSA, M. C. A. Exposure to Anacardiaceae volatile oils and their constituents induce lipid peroxidation within food-borne bacteria cells. *Molecules (Basel, Suíça)* vol. 17,8 9728-40J. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6268019/> Acesso em: 26 jan. 2021.
- MORAES, J. R. E.; CORREIA, P. H. A.; CAMPLESI, A. C.; MORAES, F. R. Experimental use of fibrin glue derived from snake venom in non-pregnant canine uterus. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.** 10(2): 133-43, 2004. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992004000200003 Acesso em: 17 jan. 2021.
- NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- OLIVEIRA, I. C. F.; PAULA, M. O.; LASTRA, H. C. B.; ALVES, B. B.; MORENO, D. A. N.; YOSHIDA, E. H.; AMARAL FILHO, J.; COGO, J. C., VARANDA, E. A.; RAI, M.; SANTOS, C. A.; OSHIMA-FRANCO, Y. Activity of silver nanoparticles on prokaryotic cells and Bothrops jararacussu snake venom. **Drug Chem Toxicol.** Jan;42(1):60-64. doi: 10.1080/01480545.2018.1478850. 2019

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29961355/> Acesso em: 21 jan. 2021.

PAL, S.; TAK, Y.; SONG, J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1712-1720, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17261510/#:~:text=To%20our%20knowledge%2C%20this%20is,col> i. Acesso em: 17 jan. 2021.

PANDIAN, S.R.K.; DEEPAK, V.; KALISHWARALAL, K; VISWANATHAN, P.; GURUNATHAN, S. Mechanism of bactericidal activity of Silver Nitrate – a concentration dependent bi-functional molecule. **Braz. J. Microbiol.** 41.3, 2010 Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822010000300033 Acesso em: 26 jan. 2021.

PERCIVAL, S. L.; BOWLER, P. G.; RUSSELL, D. Bacterial resistance to silver in wound care. *Journal of Hospital Infection*, v. 60, n. 1, p. 1-7, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15823649/>. Acesso em: 17 jan. 2021.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997.

PIRKLE H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. *Thrombosis and Haemostasis. Scientific and Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic Factors*. Mar;79(3):675-83, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2057929/>. Acesso em: 17 jan. 2021.

RAHAL, S. C.; AMARAL, M. S. P.; PAI, V. D.; BARRAVIERA, S. R. C. S.; CAPORAL E. H. G.; CROCCI, A. J. Effect of fibrin glue derived from snake venom on the viability of autogenous split-thickness skin graft. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. 10(2): 161-72, 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S167891992004000200006. Acesso em: 17 jan. 2021.

RADOSEVICH, M, GOUBRAN, H. A.; BURNOUF, T. Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties and current clinical use. **Vox Sang.** 72:133-43, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9145483/> Acesso em: 17 jan. 2021.

RHIM J W; HONG S I; PARK H M; NG P.K. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. **J.Agric. Food Chem.** 9;54(16):5814-22, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16881682/>. Acesso em: 26 jan, 2021.

RICKETTS, C. R.; LOWBURY, E. J. L.; LAWRENCE, J. C.; WILKINS, M. D. Mechanism of Prophylaxis by Silver Compounds against Infection of Burns. **Br Med J** . 23 de maio; 2 (5707): 444-446, 1970. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4986877/>. Acesso em: 17 jan. 2021.

ROSSO, M.; OYADOMARI, A. T.; POMINI, K. T.; DELLA COLETTA, B. B.; SHINDO, J.; FERREIRA JÚNIOR, R. S.; BARRAVIERA, B.; CASSARO, C. V.; BUCHAIM, D. V., TEIXEIRA, D. B., BARBALHO, S. M., ALCALDE, M. P., DUARTE, M.; ANDREO, J. C.; BUCHAIM, R. L. Photobiomodulation Therapy Associated with Heterologous Fibrin Biopolymer and Bovine Bone Matrix Helps to Reconstruct Long Bones. *Biomolecules*, 10(3), 383. 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10030383> Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7175234/> Acesso em: 26 jan. 2021.

RUSSELL, A. D.; HUGO, W. B.; Antimicrobial Activity and Action of Silver. **Progress in Medicinal Chemistry**. 351-370, 1994. doi:10.1016/s0079-64 68 (08)70024-9 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079646808700249> Acesso em: 17 jan. 2021.

SAMPAIO R. L.; RANZANI J. J. T.; BRANDÃO C. V. S.; THOMAZINI-SANTOS, I. A.; BARRAVIERA, B.; BARRAVIERA, S. R. C. S.; GIANNINI, M. J. S. M. Use of fibrin glue derived from snake venom in the repair of deep corneal ulcers – experimental study in dogs. **J Anim Toxins incl Trop Dis**. 13(4): 857-73, 2007. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/70083>. Acesso em: 17 jan. 2021.

SARKAR, S.; JANA, A. D.; SAMANTA, S. K.; MOSTAFA G. Facile synthesis of silver nano particles with highly efficient anti-microbial property. **Polyhedron** 26 :4419-4426 2007. Disponível em; <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0277538707003397> Acesso em 07 fev. 2021.

SARTORI, R.; PRESTES, N.C.; THOMAZINI, I. A.; MENDES-GIANNINI, M. J.; TOSCANO, E.; CANAVESSI, A. M. O.; BARRAVIEIRA, B. Use of fibrin glue derived from snake venom in testicular biopsy of rams. **J Venom Anim Toxins**. 4 n.1, 1998. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-79301998000100003 Acesso em: 17 jan. 2021.

SCHIERHOLZ, J. M.; BEUTH, J.; PULVERER G. “Silvercontaining polymers,” **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 43, no. 11, pp. 2819–2820, 1999. Disponível em: <https://aac.asm.org/content/aac/43/11/2819.full.pdf> Acesso em: 07 fev. 2021.

SHRIVASTAVA, S.; BERA, T.; ARNAB ROY, A.; SINGH, G.; RAMACHANDRARAO, P.; DASH, D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. **Nanotechnology** 18 225103, 2007. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/18/22/225103/pdf> Acesso em: 26 jan. 2021.

SIERRA, D. H. Fibrin sealant adhesive systems: a review of their chemistry, materials properties and clinical applications. **J. Biomater. Appl.** 7, 309-52, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8473984/>. Acesso em: 17 jan. 2021.

SPOTNITZ W. D. Fibrin sealant: Past, present, and future: a brief review.

World J Surg.; 34(4):632-4, 2010 Apr. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19820991/>. Acesso em: 17 jan. 2021.

STOLF, H. O.; BARRAVIERA S. R. C. S.; THOMAZINI-SANTOS, I. A. Cola de fibrina derivada de veneno de cobra. Uso experimental em cirurgia dermatológica. In: **Anais do 48º CONGRESSO BRASILEIRO DE DERMATOLOGIA**. Curitiba: Soc Bras de Dermat.168, 1993. Disponível em: <http://www.anaisdedermatologia.org.br/> Acesso em: 17 jan. 2021.

SUN RW, CHEN R, CHUNG NP, HO CM, LIN CL, CHE CM. Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. **Chem Commun (Camb)** 28;(40):5059-61. doi: 10.1039/b510984a. 2005 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16220170/> Acesso em: 26 jan. 2021.

THOMAZINI-SANTOS, I. A.; GIANNINI, M. J. S. M.; TOSCANO, E.; MACHADO, P. E. A.; LIMA, C. R. G.; BARRAVIERA, B. The evaluation of clotting time in bovine thrombin, Reptilase®, and thrombin-like fraction of *Crotalus durissus terrificus* venom using bovine, equine, ovine, bubaline human cryoprecipitates. **J Venom Anim Toxins**. 4: 120-36, 1998. Disponível em <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XS1998170204> : Acesso em: 17 jan. 2021.

THOMAZINI-SANTOS, I. A. **Adesivo de fibrina derivado de veneno de serpente: efeito da adição do ácido epsilon-aminocapróico, do ácido tranexâmico e da aprotinina na coaptação das bordas cirúrgicas em incisões de pele de ratos**. 2000. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais) - Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2000.

THOMAZINI-SANTOS, I. A. Fibrin adhesive from snake venom: the effect of adding e-aminocaproic acid, tranexamic acid and aprotinin for coaptation of wound in rat skin incisions. **J Venom Anim Toxins**. 7(1):148-9, 2001. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-79302001000100011 Acesso em: 17 jan. 2021.

TROTT, D. J.; MOSS, S. M.; SEE, A. M.; REES, R. Evaluation of disc diffusion and MIC testing for determining susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to topical enrofloxacin/silver sulfadiazine. *Aust. Vet J*. 85(11):464-6, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-0813.2007.00223.x> Acesso em: 26 jan. 2021.

VAN NAEGELI, V. Deut. Schr. **Schweiz. Naturforsch. Ges.**, vol. 33, 174-182. 1893.

VASHCHENKO, O. V.; IERMAK, Y. L.; KRASNIKOVA, A. O.; LISETSKI, L. N. Effects of silver nitrate on the phase state of model multilayer membranes. **Biofizika**; 60(2):307-15. Russian. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26016026/> Acesso em: 26 jan. 2021.

VITERBO, F.; LUAN, F. C.; THOMAZINI-SANTOS, I. A.; GIANNINI, M. J. S. M.; FERRARI, N.; PALHARES, A.; BARRAVIERA, B.; ROSA, G. Reparação de nervo periférico com cola de fibrina feita com veneno de cobra e fibrinogênio de búfalo, cavalo, boi e humano. Trabalho experimental em ratos. **Anais In: CONGRESSO SOBRE CIRURGIA EXPERIMENTAL RELACIONADO A CIRURGIA PLÁSTICA**. Botucatu.14p.1994.

WAKSHLAK, R. B. K.; PEDAHZUR, R.; AVNIR, D. Antibacterial activity of silver-killed bacteria: the "zombies" effect. **SCI. REP.**5, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc5386105/> acesso em: 17 jan. 2021.

WIEGAND, C.; ABEL, M.; RUTH, P.; ELSNER, P.; HIPLER, U. pH Influence on Antibacterial Efficacy of Common Antiseptic Substances. **Skin Pharmacol Physiol**; 28:147-158. 2015. doi: 10.1159/000367632 Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/367632#> Acesso em: 07 fev. 2021.

ZHAO, G. J.; STEVENS, S. E. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. **Biometals**, v. 11, p. 27-32, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9450315/> Acesso em: 17 jan. 2021.